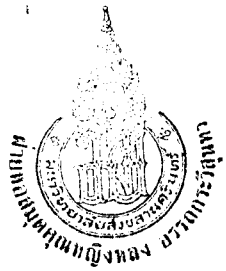


คุณลักษณะและการประยุกต์ใช้พอลิเมอร์จากเชื้อรา

Characterization and Application of Polymer from Fungi

สุภวดี สุยะลา

Supawadee Suyala

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Biotechnology

Prince of Songkla University

2550

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เลขหมู่ QP801.B69 ส74 ว550 ส.
Bib Key 300816
5 ส.ค. 2551

ชื่อวิทยานิพนธ์ คุณลักษณะและการประยุกต์ใช้พอลิเมอร์จากเชื้อรา

ผู้เขียน นางสาวสุภวดี สุยะลา

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)

.....กรรมการ

(ดร.ภาวดี เมธะคานนท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ คุณลักษณะและการประยุกต์ใช้พอลิเมอร์จากเชื้อรา

ผู้เขียน นางสาว สุภวดี สุยะลา

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2550

บทคัดย่อ

จากการเทียบเคียงชนิดของเชื้อราทนร้อนที่ผลิตพอลิเมอร์สายพันธุ์ ST29 โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวโมเลกุลในตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) พบว่า เป็น *Rhizopus oryzae* ทำการผลิตพอลิเมอร์โดยการเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* ST29 ในอาหารสังเคราะห์จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นเวลา 4 วัน เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อ *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* ในอาหาร potato dextrose broth (PDB) เป็นเวลา 18 วัน บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) เก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จากสารละลายส่วนใสโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลในปริมาตร 4 เท่า ทำไดอะไลซีส (molecular weight cut off 8,000 Da) ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำให้แห้งโดยการแช่เยือกแข็ง จากการศึกษาคุณลักษณะของพอลิเมอร์ที่ได้ พบว่าพอลิเมอร์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 26.7, 18.4 และ 2,862 กิโลดาลตัน ตามลำดับ มีหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเหมือนกัน คือ หมู่คาร์บอนิล ไฮดรอกซิล และอีเทอร์ โดยพอลิเมอร์จาก *C. dipterigena* และ *C. nipponica* เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียว คือ น้ำตาลกลูโคสโดยมีปริมาณเท่ากับ 911.02 และ 951.95 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ตามลำดับ ดังจึงนั้นจัดเป็นกลูแคน ส่วนพอลิเมอร์จาก *R. oryzae* ST29 เป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำตาลกลูโคสและโปรตีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณ 118.34 และ 108 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ตามลำดับ เมื่อทดสอบการละลาย พบว่า พอลิเมอร์ที่ได้ไม่ละลายในตัวทำละลาย 6 ชนิดที่ทดสอบ (เมทานอล เอทานอล อะซิโตน คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน) แต่ละลายได้ในน้ำในระดับที่แตกต่างกันโดยพอลิเมอร์จาก *R. oryzae* ST29 และ *C. dipterigena* ละลายน้ำได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่พอลิเมอร์จาก *C. nipponica* ละลายน้ำได้เพียงบางส่วนเท่านั้น เมื่อทดสอบคุณสมบัติการเกิดเจล พบว่า พอลิเมอร์จาก *C. dipterigena* และ *C. nipponica* สามารถฟอร์มเจลได้ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง (พีเอช 10) ที่มีเกลือ $CaCl_2.2H_20$ (2 มิลลิกรัม) มีค่าความหนืด 2,220 cP และ 3,122 cP ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์และพีเอชต่อการเกิดเจล พบว่า พอลิเมอร์จาก *C. nipponica* สามารถฟอร์มเจลได้ดีที่สุด โดยมีค่าความหนืด 9,890 cP ที่ความเข้มข้น 2.0 % พีเอช

10 และเมื่อนำพอลิเมอร์จาก *C. nipponica* (2%) มาขึ้นรูปฟิล์มโดยเติมกลีเซอรอลเป็นพลาสติไซเซอร์ พบว่า ฟิล์มมีลักษณะอ่อนนุ่ม เหนียว และยืดหยุ่น มีค่าความต้านทานแรงดึงเท่ากับ 0.668 N/mm^2 และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาดเท่ากับ 50.7 % เมื่อนำแผ่นฟิล์มจากพอลิเมอร์ที่ได้มาศึกษาการปลดปล่อยยาคลินดามัยซินโดยเปรียบเทียบกับเจลคลินดามัยซินทางการค้า พบว่า แผ่นฟิล์มพอลิเมอร์และเจลคลินดามัยซินทางการค้ามีแนวโน้มการปลดปล่อยยาที่คล้ายกันแต่ระยะเวลาและปริมาณที่ตัวยาถูกปลดปล่อยออกมาแตกต่างกัน โดยแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์จะปลดปล่อยตัวยาออกมาอย่างช้าๆ (ปลดปล่อยยาออกมามากกว่า 70 % ภายในเวลา 4 ชั่วโมง) ในขณะที่เจลทางการค้ามีลักษณะการปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็ว (ปลดปล่อยยาออกมามากกว่า 80 % ภายใน 2 ชั่วโมง) จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิเมอร์จากเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า พอลิเมอร์จากเชื้อรา *R. oryzae* ST29 มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra) กิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา (*Candida albican*) และกิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Oral human epidermal carcinoma) ในขณะที่พอลิเมอร์ที่ผลิตจากเชื้อรา *C. dipterigen* และ *C. nipponica* ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบ

Thesis Title Characterization and Application of Polymer from Fungi

Author Miss Supawadee Suyala

Major Program Biotechnology

Academic Year 2007

ABSTRACT

Thermotolerant polymer-producing fungal isolate ST29 was identified based on cell morphology and internal transcribed spacer (ITS) gene as *Rhizopus oryzae.* Production of polymer was conducted by cultivation of *Rhizopus oryzae* ST29 in palm oil mill effluent synthetic medium in 4 days compared to cultivation of *Cordyceps dipterigena* and *Cordyceps nipponica* in potato dextrose broth (PDB) for18 days on a shaker (200 rpm). The polymers were recovered by precipitation with 4 volumes of ethanol, dialysis (molecular weight cut off 8,000 Da) in distilled water for 24 h and freeze-dried. Characterization studies revealed that the three polymers had the average molecular weights of 26.7, 18.4 and 2,862 kDa., respectively. All polymers possessed the functional groups of carbonyl, hydroxyl and ether groups. Polymers produced from *C. dipterigena* และ *C. nipponica* contained only glucose with the amount of 911.02 และ 951.95 mg/g polymer, respectively. Therefore, they were classified to be glucan while polymer produced from *R. oryzae* ST29 contained glucose and protein in the amount of 118.34 and 108 mg/g polymer, respectively. The polymers were insoluble in all six solvents tested (methanol, ethanol, acetone, chloroform, dichloromethane and hexane) but soluble in water differently as polymers from *R. oryzae* ST29 and from *C. dipterigena* were soluble completely but that from *C. nipponica* was partially soluble. Polymers from *C. dipterigena* and *C. nipponica* can form gel under alkali condition (pH 10 and 2 mg of $CaCl_2$. $2H_2O$) with their viscosity of 2,220 cP and 3,122 cP, respectively. Studies on effect of concentration of the polymers from *C. nipponica* and pH on gel formation revealed that 2 % polymer at pH 10 gave the best result with the viscosity of 9,890 cP. Polymer produced from *C. nipponica* (2%) could be prepared as film with glycerol as a plasticizer. The film was soft, though and flexible, possessing tensile strength of 0.668 N/mm^2 and elongation at break of 50.7%. The film was tested for drug release (clindamycin) compared to

the commercial gel containing clindamycin. The dissolution profile indicated that the release of clindamycin from polymer film was similar to commercial gel but different in time and level of drug release. Polymer film released clindamycin slowly (clindamycin release over 70 % within 4 h) while commercial gel released drug rapidly (clindamycin released over 80 % within 2 h). Studies on bioactive activity clearly indicated that polymer from *R. oryzae* ST29 gave positive results to antibacterial activity (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra), antifungal activity (*Candida albicans*) and anticancer (oral human epidermal carcinoma) while polymers from *C. dipterigen* and *C. nipponica* gave negative results.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางในการทำวิจัย การค้นคว้าและการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัย ขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร.ภาวดี เมธะคานนท์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำหรับทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (TRF Master Research Grants: TRF-MAG) ที่สนับสนุนทุนการศึกษาและทุนวิจัย ขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่ให้ทุนอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ สำหรับการสนับสนุนด้านการเงิน และเป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด รวมถึงเพื่อนๆ พี่ๆน้องๆ และเจ้าหน้าที่ในคณะอุตสาหกรรมเกษตร สำหรับความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย ตลอดจนทุกๆ ท่านที่มิได้กล่าวมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

สุภวดี สุขะลา

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	30
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	
วัสดุ	31
อุปกรณ์	32
วิธีการวิเคราะห์	32
วิธีการทดลอง	
1. การเทียบเคียงชนิดของเชื้อราทนร้อน	
1.1 การเทียบเคียงเชื้อโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา	33
1.2 การเทียบเคียงเชื้อด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล	33
2. การผลิตพอลิเมอร์จากเชื้อราและการทำบริสุทธิ์บางส่วน	33
3. ศึกษาคุณลักษณะบางประการของพอลิเมอร์	
3.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วย Gel Permeation Chromatography	34
3.2 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์	34
3.3 ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์	34

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
3.4 คุณสมบัติการละลายของพอลิเมอร์	36
3.5 คุณสมบัติการเกิดเจล	36
4. คุณสมบัติของฟิล์มจากพอลิเมอร์ของเชื้อรา	
4.1 การทำแผ่นฟิล์มจากพอลิเมอร์ของเชื้อรา	36
4.2 คุณสมบัติของแผ่นฟิล์ม	37
4.3 การทดสอบการปลดปล่อยยาจากแผ่นฟิล์ม	37
5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิเมอร์จากเชื้อรา	
5.1 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย	38
5.2 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา	39
5.3 กิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็ง	40
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	
1. การเทียบเคียงชนิดของเชื้อราทนร้อน	
1.1 การเทียบเคียงเชื้อโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา	42
1.2 การเทียบเคียงเชื้อด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล	42
2. การผลิตพอลิเมอร์จากเชื้อราและการทำบริสุทธิ์บางส่วน	45
3. ศึกษาคุณลักษณะบางประการของพอลิเมอร์	
3.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วย Gel Permeation Chromatography	48
3.2 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์	49
3.3 ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์	51
3.4 คุณสมบัติการละลายของพอลิเมอร์	55
3.5 คุณสมบัติการเกิดเจล	56
4. คุณสมบัติของฟิล์มจากพอลิเมอร์ของเชื้อรา	
4.1 การทำแผ่นฟิล์มจากพอลิเมอร์ของเชื้อรา	59
4.2 คุณสมบัติของแผ่นฟิล์ม	61

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 การทดสอบการปลดปล่อยยาจากแผ่นฟิล์ม	62
5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิเมอร์จากเชื้อรา	
4.3 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย	69
4.4 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา	69
4.5 กิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็ง	69
4. สรุปผลการทดลอง	68
ข้อเสนอแนะ	70
เอกสารอ้างอิง	71
ภาคผนวก	81
ประวัติผู้เขียน	89

รายการตาราง

ตาราง		หน้า
1.	ตัวอย่างประเภทของพอลิเมอร์ชีวภาพ	7
2.	โครงสร้างทางเคมีของโฮโมพอลิแซคคาไรด์	15
3.	โครงสร้างทางเคมีของเฮทเทอโรพอลิแซคคาไรด์	16
4.	ชนิดและฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิเมอร์จากเชื้อรา	19
5.	หน้าที่ของพอลิเมอร์ (Pharmaceutical Necessities) ในรูปแบบยาเตรียม	25
6.	การประยุกต์ใช้พอลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์	29
7.	การแปลผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย	39
8.	การแปลผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา	40
9.	การแปลผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็ง	41
10.	น้ำหนักโมเลกุล และการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ โดย Gel Permeation Chromatographt (GPC)	48
11.	ลักษณะสเปคตรัมที่เกิดขึ้น และ wave number ของหมู่ฟังก์ชันที่ดูดกลืนแสงจากพอลิเมอร์เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR	51
12.	คุณสมบัติในการละลายของพอลิเมอร์จากเชื้อรา *R. oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *C. nipponica*	56
13.	ทดสอบคุณสมบัติการเกิดเจลของพอลิเมอร์จากเชื้อ *Rhizopus oryzae, Cordyceps dipterigena* และ *C. nipponica*	57
14.	ผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ต่อการเกิดเจลของพอลิเมอร์จากเชื้อ *Cordyceps nipponic*	58
15.	ผลของพีเอชต่อคุณสมบัติการเกิดเจลของพอลิเมอร์จากเชื้อ *Cordyceps nipponic*	58
16.	ค่าความหนา การต้านทานแรงดึงขาด และการยืดตัวเมื่อขาดของพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Cordyceps nipponic*	63
17.	ฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิเมอร์จากเชื้อรา	67
18.	การปลดปล่อยตัวยาจากแผ่นฟิล์มคลินดามัยซิน	86
19.	การปลดปล่อยตัวยาจากเจลคลินดามัยซินทางการค้า	88

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1.	สารเมตาบอไลต์ที่สร้างโดย Cordyceps สารเมตาบอไลต์ที่สร้างโดย Cordyceps (a) cordycepin (3'-deoxyaddenosine (b) cordyanhydridcs A (c) cordyanhydridcs B	6
2.	กลไกการเกิดเจลของ calcium alginate (Egg-box model)	23
3.	แสดงช่องทางบนร่างแหพอลิเมอร์สำหรับให้สารเคลื่อนที่ผ่าน	27
4.	ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากเชื้อราทนร้อนสายพันธุ์ ST29 : (A) ด้านหน้าโคโลนี (B) ด้านหลังโคโลนี : (C) brownish rhizoids , (D) broad hyphae และ lemon-shape sporangiospores with striate surfaces, (E) chlamydospores, (F) sporangiophores with columella	43
5.	ลำดับเบสของเชื้อราทนร้อนสายพันธุ์ ST29 ซึ่งมีความเหมือนกับ *Rhizopus oryzae*	44
6.	ค่าการเจริญ การผลิตพอลิเมอร์ และค่าพีเอชของเชื้อรา *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDB บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	46
7.	ลักษณะของพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* หลังจากตกตะกอนด้วยเอทานอล	48
8.	ลักษณะปรากฏของพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* หลังจากผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง	48
9.	อินฟาเรดสเปคตรัมของพอลิเมอร์จาก *Rhizopus oryzae* ST29 *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica*	49
10.	อินฟาเรดสเปคตรัมของกลูแคนจาก *Saccharomyces cerevisiae*	50
11.	การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Rhizopus oryzae* ST29 *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* HPLC chromatogram ของน้ำตาลมาตรฐาน	52

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12.	HPLC chromatogram ของพอลิเมอร์จาก *Rhizopus oryzae* ST29 *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica*	54
13.	ลักษณะของแผ่นฟิล์มที่ขึ้นรูปจากพอลิเมอร์จาก *Cordyceps nipponic*	61
14.	การปลดปล่อยตัวยาคลินดามัยซินของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Cordyceps nipponic*	64
15.	กราฟมาตรฐานของคลินดามัยซิน ใน phosphate buffer พีเอช 7.4	85

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

จุลินทรีย์สามารถสร้างสารพอลิเมอร์ชีวภาพได้เมื่อเจริญในสภาวะที่เหมาะสม (Kim *et al.*, 2003) เช่น แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส และรา สารพอลิเมอร์ชีวภาพเหล่านี้มีทั้งที่เป็นพอลิแซคคาไรด์ โปรตีน หรือไขมันเป็นองค์ประกอบ พอลิเมอร์ที่เป็นที่รู้จักกันดีและปัจจุบันมีการนำมาประยุกต์ใช้ และยอมรับเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเทคโนโลยีชีวภาพ คือ พอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งปัจจุบันมีการผลิตทางการค้า และมีการนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านสุขภาพและด้านอุตสาหกรรมในขณะที่พอลิเมอร์ชนิดอื่นๆยังอยู่ในขั้นตอนของการพัฒนาเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต (Sutherland, 1998) พอลิแซคคาไรด์หลายชนิดที่มีจำหน่ายมีทั้งที่ผลิตจากพืชและจุลินทรีย์ การผลิตพอลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบ คือ สามารถควบคุมคุณภาพของพอลิแซคคาไรด์ได้ โดยการควบคุมสภาวะที่ใช้ในการหมัก ส่วนการผลิตพอลิแซคคาไรด์จากพืชมีข้อจำกัด คือ พืชชนิดหนึ่งสามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์ได้หลายชนิดพร้อมๆกัน ทำให้ต้องมีขั้นตอนในการแยกพอลิแซคคาไรด์ที่ต้องการออกมา ทำให้มีค่าใช้จ่ายสูงขึ้น (Whistler, 1996)

พอลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจอย่างมากในส่วนของการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านสุขภาพ โดยเฉพาะพอลิแซคคาไดร์จากเชื้อรา เนื่องจากมีรายงานว่าพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์หลายชนิดที่ผลิตจากเชื้อรามีคุณสมบัติทางการแพทย์และเภสัชวิทยา เช่น สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน ใช้เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง และมีคุณสมบัติในการรักษาโรคที่เกิดจากไวรัสในมนุษย์ เช่น herpatis, hypertension, gastric cancer และ hypercholesterolaemia (Park *et al.*, 2001) เช่น พอลิแซคคาไรด์ผลิตจากเชื้อรา *Cordyceps* species มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น hypocholesterolemic และ antitumor activities (Xiao *et al.*, 2004) นอกจากนี้กลูแคนจากเชื้อราหลายชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ (anti-microbial) ยับยั้งไวรัส (anti-virus) (Sutherland, 1998) ซึ่งพอลิเมอร์จากเชื้อราสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้แตกต่างกัน เนื่องจากพอลิเมอร์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมีและทางชีวภาพที่แตกต่างกัน งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาคุณลักษณะประการของพอลิเมอร์จากเชื้อรา เพื่อหาแนวทางการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

บทตรวจเอกสาร

1. เชื้อรา

1.1 เชื้อราอุณหภูมิสูงและเชื้อราทนร้อน

เชื้อราที่เจริญในอุณหภูมิสูง หมายถึง เชื้อราในกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในแหล่งที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 20 จนถึง 50 หรือ 55 องศาเซลเซียส เช่น เชื้อ *Humicola griseathermoidea* และ *Rhizopus pussillus* ส่วนเชื้ออีกพวกหนึ่งคือเชื้อราทนร้อน หมายถึง เชื้อราในกลุ่มที่สามารถเจริญในแหล่งที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 20 จนถึงอุณหภูมิสูงถึง 50 หรือ 55 องศาเซลเซียส เช่น เชื้อ *Aspergillus fumigatus*, *Geotrichum* sp. (Cooney, 1964 อ้างโดยมานะ กาญจนมณีเสถียร, 2537)

มานะ กาญจนมณีเสถียร (2537) แยกเชื้อราที่เจริญในอุณหภูมิสูงจากวัสดุ ได้แก่ ขี้เลื่อย รำข้าว กากปาล์มน้ำมันและถ่านแกลบ โดยวิธี Modified soilo plate technique ได้เชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ *Rhizopus pussillus*, *Chaetomium thermophile* และ *Thermomyces lanuginosus* ส่วน วสันต์ เพชรรัตน์ และมานะ กาญจนมณีเสถียร (2533) พบเชื้อรา 10 ชนิดที่เจริญในอุณหภูมิสูงและเชื้อราทนร้อนจากปุ๋ยหมักสำหรับเพาะเห็ดฟาง เป็นราพวก *Aspergillus fumigatus* มากที่สุด มีความถี่ในการพบระหว่าง 83-100 % รองลงมา คือ *Thermomyces lanuginosus* โดยมีความถี่ในการพบ 10-33 % ส่วนเชื้อราชนิดอื่นๆจัดว่าพบน้อยมาก

Razak และคณะ (1996) ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus rhizopodiformis* ที่แยกได้จากน้ำทิ้งในโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และ พีเอช 7 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูง (> 90%) โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus rhizopodiformis* มีความคงตัวดีกว่า *Rhizopus oryzae* แหล่งของไลเปสพบทั้งพืช สัตว์ จุลินทรีย์ โดยเฉพาะในจุลินทรีย์ปัจจุบันได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณสูงและมีความคงตัวดี จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น *Aspergillus niger* และ *Pseudomonas fluorescens* (Sugihara *et al.*, 1988 อ้างโดยวุฒิชัย พิชัยยุทธ์, 2538)

ปรีชา มุณีศรี (2538) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้จุลินทรีย์ คือเชื้อรา *Aspergillus niger* ATCC6275, *Aspergillu oryzae* เชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* F-129, *Candida palmeoliophila* Y-128 และจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูง (45 องศาเซลเซียส) 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม คือ เชื้อราสายพันธุ์ ST4 และ ST29 จากการเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดน้ำมันในน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ ST29 ซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถกำจัดน้ำมันได้สูงสุด (99.65%) ค่าซีโอดีลดลง 66% และได้

ปริมาณมวลชีวภาพ 44.56 กรัมต่อลิตร ที่เวลาการเลี้ยงเชื้อ 4 วัน และเมื่อศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter ด้วยเชื้อราสายพันธุ์ ST29 ในสภาพปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อพบว่า ในสภาพปลอดเชื้อสามารถกำจัดน้ำมันและกรีสได้ 99.01% ค่าซีโอดีลดลง 69% และได้ปริมาณมวลชีวภาพ 48.19 กรัมต่อลิตร ส่วนภายใต้สภาวะไม่ปลอดเชื้อน้ำมันและกรีสลดลง 90.30% ค่าซีโอดีลดลง 73% และได้ปริมาณมวลชีวภาพ 44.87 กรัมต่อลิตร

จากการบำบัดน้ำทิ้งในโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เชื้อราทนร้อนที่ผลิตพอลิเมอร์จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Rhizopus* sp. ST4 และ *Rhizopus* sp. ST29 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อเป็นเวลา 3 วัน พบว่า *Rhizopus* sp. ST4 สามารถกำจัดน้ำมันและกรีสได้เท่ากันทั้ง 2 สภาวะ (84.2%) แต่ภายใต้สภาวะไม่ปลอดเชื้อสามารถกำจัดซีโอดี (62.2%) ได้สูงกว่าสภาวะปลอดเชื้อ (53.4%) เท่ากับ 8.8% สำหรับ *Rhizopus* sp. ST29 สภาวะปลอดเชื้อให้ค่าการกำจัดน้ำมันและกรีส (91.4%) และค่าการกำจัดซีโอดี (62.2%) สูงกว่าได้จากการเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อ (11% และ 25.4% ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 สายพันธุ์ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อพบว่า *Rhizopus* sp. ST29 ให้ค่าการกำจัดน้ำมันและกรีส (91.4%) และค่าการกำจัดซีโอดี (62.2%) สูงกว่าค่าที่ได้จากสายพันธุ์ ST4 ส่วนการบำบัดภายใต้สภาวะไม่ปลอดเชื้อพบว่า *Rhizopus* sp. ST4 กำจัดน้ำมันและกรีสได้เท่ากันทั้ง 2 สภาวะ (84.2%) และค่ากำจัดซีโอดี (62.2%) สูงกว่าค่าที่ได้จาก *Rhizopus* sp. ST29 (80.5% และ 40.6% ตามลำดับ) (Pechsuth *et al.*, 2001) ส่วนการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแบบไร้อากาศที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) ที่ผ่านและไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้นโดยใช้เชื้อราทนร้อนที่ผลิตพอลิเมอร์คือ *Rhizopus* sp. ST4 พบว่าน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นมีค่าการลดลงของซีโอดีสูงกว่า (72.6%) แต่การผลิตก๊าซชีวภาพ (0.97 ลบ.ม. ต่อลบ.ม.ต่อวัน) ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้น (Pechsuth *et al.*, 2001)

หัสลินดา บินมะแอ (2548) บำบัดน้ำทิ้งในโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เชื้อราทนร้อนที่ผลิตพอลิเมอร์ พบว่าเชื้อ *Humicola insulens, Thermomyces lanuginusus* และ *Rhizopus* sp. ST29 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55, 50 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเชื้อ *Rhizopus* sp. ST29 เป็นเชื้อที่มีผลดีที่สุด ซึ่งสามารถให้มวลชีวภาพ 18.3 กรัมต่อลิตร ปริมาณพอลิเมอร์ชีวภาพ 26.88 มิลลิกรัมพอลิเมอร์ต่อกรัมมวลชีวภาพ กำจัดน้ำมันและกรีส 98.66% กำจัดค่าซีโอดีได้ 72.7% ลดปริมาณของแข็งทั้งหมดได้ 60.5% และทำให้น้ำทิ้งมีตะกอนน้อยลง มีความใสมากขึ้นในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และเมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส ไซลาเนส เพคติเนส และไลเปสพบว่า *Rhizopus* sp. ST29 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด (1574.42 ยูนิตต่อมิลลิตร) รองลงมา คือ เพคติเนส (889.99 ยูนิตต่อมิลลิตร), คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (814.66 ยูนิตต่อมิลลิตร) และไลเปส (0.19 ยูนิตต่อมิลลิตร) นอกจากนี้การใช้น้ำนึ่งปาล์มและกาก

ปาล์มในการแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส สามารถแยกเชื้อราได้ 34 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ F11 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีในสับเสตรททั้งสองชนิด เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมพบว่าได้ผลผลิตของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 4 เท่า (Prasertsan *et al.*, 2001) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Myceliophthora thermophaila* IFO 31843 และ *Aspergillus niger* ATCC6275 พบว่า *Aspergillus niger* ATCC 6275 ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส ไซลาเนส และเบต้า-กลูโคซิเดส ได้สูงสุดทั้งในการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวและอาหารแข็ง โดยกากปาล์มเป็นสับเสตรทที่ดีกว่าเส้นใยปาล์มในการผลิตเอนไซม์ตลอดจนการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายให้ได้น้ำตาล (saccharification) (Prasertsan and Oi., 2001)

1.2 เชื้อราแมลง

เชื้อราในกลุ่มนี้ถูกเรียกว่า entomopathogenic, entomogenous หรือ insect fungi Hyel-Jones (1993) รายงานถึงการค้นพบเชื้อราสาเหตุของโรคแมลงจำนวนมากกว่า 200 ชนิด ซึ่งเชื้อราจำนวนมากในกลุ่มนี้สามารถเทียบเคียงชื่อในระดับชนิดมี 81 ชนิด ที่เหลืออีก 127 ชนิด อาจเป็นชนิดใหม่ ส่วนเชื้อ *Cordyceps* นั้นจัดเป็นตัวแทนที่ดีของเชื้อราที่ทำลายแมลง จากการศึกษาและรวบรวมในระหว่างปี 1989-1993 พบเชื้อ *Cordyceps* 42 ชนิด โดยส่วนใหญ่พบกับแมลงบริเวณส่วนของต้นพืชที่อยู่เหนือดิน ส่วนในปี 1994 พบเชื้อ *Cordyceps* ชนิดใหม่จำนวน 20 ชนิด ดังนั้นในระยะเวลา 6 ปี สามารถตรวจพบเชื้อ *Cordyceps* มากถึง 62 ชนิด ในจำนวนนี้มีการให้ชื่อในระดับชนิดจำนวน 12 ชนิด

แหล่งที่พบ *Cordyceps* มักจะแตกต่างกันไปตามแหล่งอาศัยของ host ซึ่งอาจจะฝังตัวอยู่ในดินซากพืชที่ทับถม หรือไม้ผุ สปีชีส์ที่พบตามพื้นดิน เช่น สปีชีส์ที่เจริญบนหนอนผีเสื้อจะสร้าง stroma ที่มีก้านชูขึ้นมาเหนือพื้นดิน ส่วนใหญ่พบในฤดูฝนเนื่องจากเชื้อราต้องการความชื้นสูงในการเจริญเพื่อเจริญผ่านชั้นดินขึ้นไป เช่น สปีชีส์ที่เจริญบนมวน มด ต่อ และผึ้ง ก็จะพบตามผิวหน้าดินเช่นเดียวกัน โดยที่ stroma ไม่ได้เจริญผ่านชั้นดินขึ้นมาแต่จะเจริญผ่านชั้นของใบไม้ที่คลุมแมลงอยู่ ส่วนสปีชีส์ที่พบตามส่วนต่างๆของพืชที่แมลงอาศัยอยู่มักจะพบได้ตลอดทั้งปีโดยส่วนใหญ่พบตามใต้ใบไม้ เนื่องจากแมลงจะอาศัยอยู่เพื่อการพรางตัวจากศัตรูธรรมชาติ อีกทั้งยังเป็นการกำบังตัวเองจากสภาพแวดล้อม (Benjamin *et al.*, 2000)

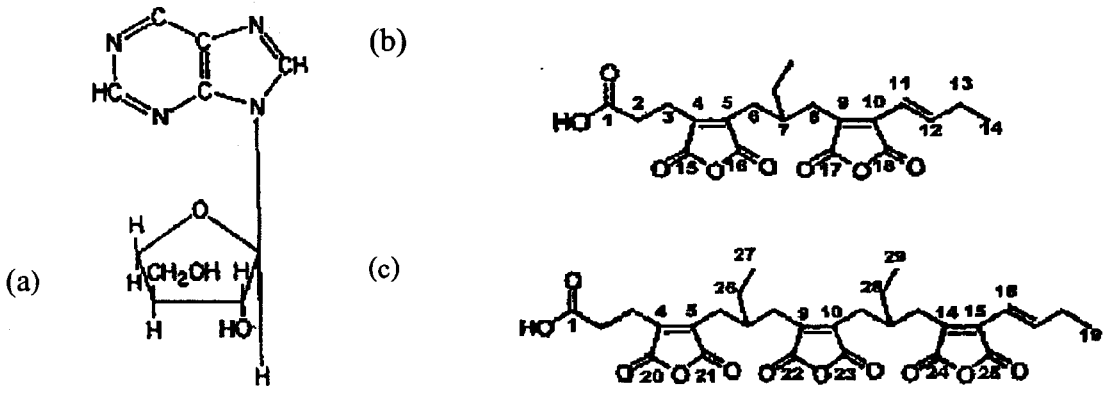
จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Cordyceps* โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* แต่ละสปีชีส์เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิดคือ corn meal agar, Czapek's agar, malt extract agar, oat meal agar และ potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15-60 วัน พบว่า *Cordyceps* ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในอาหาร potato dextrose agar รองลงมาคืออาหาร malt extract agar, corn meal agar, oat meal agar และ Czapek's agar ตามลำดับ และเมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ (อุณหภูมิห้อง : 27$\pm$ 2, 20,

25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15-60 วัน พบว่า *Cordyceps* ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสแต่มี 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Cordyceps iranensis*, *Cordyceps* sp.1 และ *Cordyceps* sp.2 เจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการทดลองไม่มีสปีชีส์ใดที่สามารถจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส นอกจากนี้การศึกษาการเจริญของเชื้อบนอาหารวุ้นที่พีเอชต่างๆ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร potato dextrose agar ปรับพีเอชเป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-60 วัน พบว่า *Cordyceps* ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในอาหาร potato dextrose agar ที่มีพีเอช 5-6 ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 8 พบว่าเชื้อ *Cordyceps* เจริญได้ไม่ดี (วารุณี บวรรัตโตภาค, 2546)

Evans (1974) รายงานว่าประโยชน์ของเชื้อ *Cordyceps* ที่มีต่อมนุษย์นั้นน่าจะเกิดจากสารที่ผลิตออกมา (metabolite) มากกว่าการที่จะนำเชื้อไปใช้โดยตรง สำหรับเชื้อราอื่นๆนั้น ยอดหทัย และคณะ (2544) ได้รายงานว่าเชื้อรา *Aschersonia tubulata* สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Triterpenoids แต่ออกฤทธิ์ในระดับปานกลาง ส่วนเชื้อ *Cordyceps unilateralis* ก็ผลิตสารที่ออกฤทธิ์ในระดับปานกลางเช่นกัน แต่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย โดยที่สารดังกล่าวเป็นสารพวก naphthoquinones นอกจากนั้นยังรายงานว่า *Paecilomyces tenuipes* ผลิตสารพวก cyclodepsipeptide ได้ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียและวัณโรคได้ในระดับปานกลาง มีหลักฐานว่าคนจีนใช้สมุนไพรจาก *Cordyceps* sp. มายาวนานกว่า 2000 ปี (Hywel- Jones 1993) เชื้อรา *Cordyceps sinensis* เป็นเชื้อราทำลายหนอนผีเสื้อ โดยสปอร์ของเชื้อ *Cordyceps sinensis* จะเจริญภายในตัวหนอนจนมีเส้นใยเต็มอยู่ภายใน และเมื่อหนอนผีเสื้อตายเชื้อราจะผลิตโครงสร้างของเชื้อราที่สร้างเพื่อขยายพันธุ์หรือผลิตสปอร์ จากนั้นสปอร์จะปลิวไปตามลมและเข้าทำลายหนอนผีเสื้อในรุ่นต่อไป ในปัจจุบันนิยมนำเชื้อรา *Cordyceps sinensis* ซึ่งเรียกเป็นภาษาจีนแต้จิ๋วว่า "ถั่งเฉ้า" มาผสมในอาหารเสริมจำพวกซุปไก่สกัดเป็นต้น ในปัจจุบันมีการนำมาทำเป็นการค้าในรูปแบบต่างๆ

Cordyceps มีประโยชน์ในการสร้างสารเมตาโบไลท์หลายชนิดเช่น cordycepin sinv 3'-deoxyyadennosine สร้างโดย *Cordyceps militaris* เป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ และยังนำไปใช้ประโยชน์ทางชีวภาพในการต่อต้านการเกิดเนื้องอก (antitumor activities) ได้อีกด้วย (Chang and Hayes, 1978 อ้างโดย วารุณี บวรรัตโตภาค, 2546) สาร rythrostominone, deoxyerythrostominon, 4-*O*-methyl erythrostominon, epierythrostominol, dexycrythrostrominal และ 3, 5, 8-trihydroxy-6-methoxy-295-oxohexa-1, 3-dieny-1, 4-naphthoquinone ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพในกลุ่ม naphthoquinones สร้างโดย *Cordyceps unilateralis* BCC1896 ที่เลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth สารประกอบทั้ง 6 ชนิดนี้มีผลในการต่อต้านเชื้อสาเหตุโรคมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* (Kittakoop *et al.,* 1999) นอกจากนี้

Cordyceps บางสปีชีส์ยังมีความสามารถในการสร้างสารประกอบชนิดใหม่อีกด้วย เช่น *Cordyceps pseudomilitalis* สร้างสาร cordyanhyides A และ B (ภาพที่ 1) สารประกอบทั้งสองชนิดนี้จัดเป็นสารที่พบได้ยากในธรรมชาติ (Isaka *et al.*, 2001)



ภาพที่ 1 สารเมตาบอไลต์ที่สร้างโดย *Cordyceps* (a) cordycepin (3'-deoxyaddenosine (b) cordyanhydridcs A (c) cordyanhydridcs B

Figure 1 Metabolyte produced by *Cordyceps* (a) cordycepin (3'-deoxyaddenosine (b) cordyanhydridcs A (c) cordyanhydridcs B

ที่มา : Isaka และคณะ (2001)

2. พอลิเมอร์ชีวภาพ

พอลิเมอร์ชีวภาพ คือพอลิเมอร์ที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตมีทั้งผลิตโดยพืช สาหร่าย และ จุลินทรีย์ พอลิเมอร์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เช่นแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส และราภายใต้สภาวะที่เหมาะสมมีลักษณะข้นหนืดและมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Margaritis and Pace, 1985 อ้างโดย ระพีพรรณ เติมตันท์, 2547) โดยพอลิเมอร์เหล่านี้มีคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพรวมถึงองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน โดยใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอร์แบบควบแน่น (condensation) ซึ่งในการเกิดปฏิกิริยาจะทำโมเลกุลเล็กๆ ที่มีอยู่ในโครงสร้างของโมโนเมอร์ขาดหายไป เมื่อเปรียบเทียบหน่วยที่ซ้ำๆกันในโครงสร้างของพอลิเมอร์กับโมโนเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์พอลิเมอร์ชนิดนั้น ในการเชื่อมต่อหน่วยย่อยหรือโมโนเมอร์เข้าด้วยกัน (ชัยวัฒน์ เจนวานิชย์, 2526)

2.1 ประเภทของพอลิเมอร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์

การจำแนกประเภทของพอลิเมอร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์มีหลายแบบขึ้นอยู่กับเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างประเภทของพอลิเมอร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์

Table 1 Types of biopolymers from microorganisms

เกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนก	ประเภทพอลิเมอร์	ตัวอย่างพอลิเมอร์	จุลินทรีย์
จำแนกตามกระบวนการสังเคราะห์	พอลิเมอร์ภายนอกเซลล์ (extracellular polrmer) เป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์และจุลินทรีย์หลั่งพอลิเมอร์ออกมาภายนอกเซลล์ใน 2 รูปแบบ คือ แคปซูลซึ่งยึดติดอยู่กับผนังเซลล์และในรูปของเมือกซึ่งปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมรอบๆเซลล์	พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide)	*Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694 *Aschersonia samoensis* BCC2466 *Beauveria bassiana* BCC2692 *Cookenia tricholoma* BCC2468 *Fusarium coccophilum* BCC2415 *Hypocrella tamurai* BCC2350 *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 *Aspergillus japonica* *Botyrtis cinerea* *Penicillium acametii* *Phoma herbarum* *Rhizoctonia* sp.
	พอลิเมอร์ภายในเซลล์ (intracellular polymer) เป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์ ต้องอาศัยการสกัดและการทำบริสุทธิ์เพื่อนำเอาพอลิเมอร์ออกมาจากเซลล์	พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-β-hydroxybutyrate)	*Sclerotium glucanicum* *Alcaligenes* sp.

ตารางที่ 1 ตัวอย่างประเภทของพอลิเมอร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์ (ต่อ)

Table 1 Types of biopolymers from microorganisms (Cont.)

เกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนก	ประเภทพอลิเมอร์	ตัวอย่างพอลิเมอร์	จุลินทรีย์
จำแนกตามประจุไฟฟ้าที่อยู่บนโมเลกุลของพอลิเมอร์	• พอลิแซคคาไรด์ที่มีประจุลบ (anionic polysaccharide)	แซนแทน (xanthan)	*Xantomonas campestris*
	• พอลิแซคคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide)	พูลลูแลน (pullulan)	*Aureobasidium pullunans*
		สเคอโรกลูแคน (scleroglucan)	*Sclerotium* spp.
		ไคโตแซนซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของราอันดับ Mucorales	*Mucor rouxii*
	• พอลิแซคคาไรด์ที่มีประจุบวก (cationic หรือ basic polysaccharide)		*Absidia coerulea*
จำแนกตามโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ	• โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) คือ พอลิเมอร์ที่มีหน่วยซ้ำๆกันเพียงชนิดเดียวเท่านั้นได้แก่ เบต้ากลูแคน (β - D - glucan) แอลฟากลูแคน (α - D - glucan)	สเคอโรกลูแคน(scleroglucan)	*Sclerotium* spp.
		พูลลูแลน (pullulan)	*Aureobasidium pullunans*
	• เฮทเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) คือพอลิเมอร์ที่มีหน่วยซ้ำๆกัน 2 ชนิดหรือมากกว่า 2 ชนิด	แซนแทน (xanthan)	*Xantomonas campestris*

ที่มา : ดัดแปลงจาก วีรพันธ์ เดิมหลิ่ม และพูนสุข ประเสริฐสรรพ์ (2540); Madla และคณะ (2004)

2.2 พอลิเมอร์ชีวภาพจากเชื้อรา

จุลินทรีย์สามารถสร้างสารพอลิเมอร์ชีวภาพได้เมื่อเจริญในสภาวะที่เหมาะสม (Kim *et al.*, 2003) สารพอลิเมอร์ชีวภาพเหล่านี้มีทั้งที่เป็นพอลิแซคคาไรด์ โปรตีน หรือไขมันเป็นองค์ประกอบ มีรายงานว่าเชื้อราหลายชนิดสามารถผลิตพอลิเมอร์ประเภทพอลิแซคคาไรด์ได้ เช่น *Cordyceps sp. Aspergillus japonica*, *Botyrtis cinerea*, *Phoma herbarum Rhizoctonia* sp. เป็นต้น (Selbmann *et al.*,2003) พอลิแซคคาไรด์ที่ถูกสังเคราะห์ภายในเซลล์และถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์เรียกพอลิแซคคาไรด์ประเภทนี้ว่า exopolysaccharide พอลิแซคคาไรด์ที่ถูกขับออกมานี้อาจเกาะติดกับผิวเซลล์ของจุลินทรีย์ทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่าแคปซูล (capsule) บางครั้งพอลิแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์ขึ้นอาจถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงทำให้มีลักษณะเป็น

เมือก (Sutherland, 1998) มีรายงานว่าพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์หลายชนิดที่ผลิตจากเชื้อรามีคุณสมบัติทางการแพทย์และเภสัชวิทยา เช่น สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน ใช้เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง และมีคุณสมบัติในการรักษาโรคที่เกิดไวรัสในมนุษย์ เช่น herpatis, hypertension, gastric cancer และ hypercholesterolaemia (Park *et al.*, 2001)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์จากเชื้อรา

2.3.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 % ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 % ในการสังเคราะห์เซลล์ ในกระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนและต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมทั้งชนิดและปริมาณความเข้มข้นสำหรับเชื้อรา *Paecilomyces sp.*I1 แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดซึ่งดีกว่าการใช้มอลโตส ซูโครส ฟรุกโตส กลูโคส และ กาแลคโตส ตามลำดับ โดยเชื้อเจริญและให้ผลผลิตของพอลิแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 312 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 750 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยังให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสารแขวนลอยของ *E. coli* สูงสุดด้วย (Takagi and Kadowaki, 1985 อ้างโดยวีรพันธ์ เดิมหลิ่ม และ พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2540)

ซูโครส (10 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ออกนอกเซลล์ของเชื้อรา *Auricularia polytricha* ให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 8.26 กรัมต่อลิตร และ 1.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน (Xu and Yun., 2003) จากเชื้อรา *Cordypes militraris* (strain C738) และ *Paecilomyces sinclairri* (8.59 กรัมต่อลิตร และ 12.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) และผลิต exo-biopolymer ได้สูงสุด (0.65 กรัมต่อลิตร และ 1.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนดีกว่ามอลโตสและกลูโคส (Kim *et al.*, 2003) เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Park และคณะ (2001) ซึ่งพบว่าเชื้อรา *Cordyceps militaris* สามารถเจริญและผลิต exo-biopolymer ได้สูงสุดเท่ากับ 12.75 กรัมต่อลิตร และ 0.95 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส (2 % w/v) อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate, μ_{max}) และผลผลิตของผลิตภัณฑ์ (yield cofficient,$Y_{P/S}$) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นส่วนประกอบเท่ากับ 0.142 h^{-1} และ 0.29 h^{-1} ตามลำดับ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นในช่วง 10-60 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อเจริญและผลิต exo-biopolymer ได้สูงสุดเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และสอดคล้องกับผลของ Kim และ Yun (2005) ซึ่งพบว่า *Cordypes militraris* และ *Cordypes sinensis* สามารถเจริญ (22.9 กรัมต่อลิตร

และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) และผลิต exo-biopolymer (20.9 กรัมต่อลิตร และ 4.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส (4 % และ 2% w/v ตามลำดับ)

2. แหล่งไนโตรเจน

ราสามารถใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียได้ดีกว่ารูปไนเตรต ราบางชนิดใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียหรืออินทรีย์ไนโตรเจน แต่จะไม่ใช้ในรูปไนเตรต เช่น *Absidia* sp., *Mucor* sp. *Rhizopus nigricans* และ *Rizopus oryzae* เป็นต้น เพราะเกลือไนเตรตจะมีผลทำให้เกิดสภาวะเป็นด่างในอาหารทำให้ค่าพีเอชมีค่าสูงขึ้น (Jenning, 1995) จากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของไมซีเลียมและการผลิต exo-biopolymer จากเชื้อรา *Auricularia polytricha* พบว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อราเจริญและผลิต exo-biopolymer ได้สูงสุดเท่ากับ 6.09 กรัมต่อลิตร และ 1.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน (น้ำแช่ข้าวโพด, Casein peptone M, Martone A-1, Meat peptone, ทริปโตน,โพลีเปปโตน, Soy peptone และยีสต์สกัด) ให้ผลดีกว่าการใช้สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน (ammonium nitrate, ammonium chloride, ammonium phosphate และ sodium nitrate) (Xu and Yun, 2003) Frang และ Zhong (2002 อ้างโดย Xu and Yun, 2003) รายงานว่า *Ganoderma lucidum* เจริญและสร้างพอลิแซคคาไรด์ได้ดีเมื่อใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อรา *Paecilomyces* sp.I1 คือ โพลีเปปโตน กรดคาซามิโน (เข้มข้น 3%) ซึ่งให้ผลผลิตพอลิเมอร์สูงถึง 564 และ 398 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน และให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอน (flocculating activity) เท่ากับ 9 และ 8 ตามลำดับ สูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นรวมทั้งโซเดียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์และยูเรีย ส่วนกรดกลูตามิกให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนและผลผลิตของพอลิเมอร์ชีวภาพเท่ากับ 5 และ 154 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ รองจากพอลิเปปโตนและกรดคาซามิโน สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสำหรับการเจริญของเชื้อ คือ ยีสต์สกัดและเนื้อสกัด ให้ค่าการเจริญสูงสุด 717 และ 612 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนมอลท์สกัดให้การเจริญของเชื้อและผลผลิตของ พอลิเมอร์ต่ำสุดเท่ากับ 160 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร และ 154 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ (Takagi and Kadowaki, 1985 อ้างโดยวีรพันธ์ เดิมหลิ่ม , 2540)

Park และคณะ (2001) ศึกษาแหล่งไนโตรเจน 13 ชนิดในการเลี้ยงเชื้อรา *Cordyceps militaris* พบว่า ยีสต์สกัด, Martone A-1 และ Meat peptone (ความเข้มข้น 1%) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของไมซีเลียมให้ค่าเท่ากับ 17.00, 13.50 และ 13.50 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนการผลิต exo-biopolymer ได้ค่าสูงสุดเท่ากับ 1.97 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการ

ผลิตพอลิเมอร์คือ 10 กรัมต่อลิตร ส่วน *Cordypes sinensis* สามารถเจริญ (16.93 กรัมต่อลิตร) และผลิต exo – biopolymer (2.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน (Kim and Yun 2005)

หัสลินดา บินมะแอ (2547) เลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus* sp. ST29 ในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน โดยเติมแหล่งไนโตรเจนได้แก่ NH_4NO_3, ยูเรียและปุ๋ย (46-0-0) พบว่าปุ๋ย (46-0-0) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 18.06 กรัมต่อลิตร และ 32 มิลลิกรัมพอลิเมอร์ชีวภาพต่อกรัมมวลชีวภาพตามลำดับ และเมื่อศึกษาถึงความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยแปรผันความเข้มข้นของปุ๋ยเป็น 0.01%, 0.025%, 0.050%, 0.075%, 0.1% และ 1% (w/v) พบว่าเชื้อสามารถเจริญและผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพได้สูงสุด (19.28 กรัมต่อลิตร และ 52.19 มิลลิกรัมพอลิเมอร์ชีวภาพต่อกรัมมวลชีวภาพ ตามลำดับ) ที่ความเข้มข้นของปุ๋ย 0.025%

3. อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (1/1, 1/10, 1/20, 10/1 และ 20/1) มีผลต่อการเจริญของไมซีเลียมและการผลิต exo-biopolymer จากเชื้อรา *Cordyceps militaris* โดยใช้ซูโครสและน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้พีเอชเริ่มต้นที่ 6 พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่สูง คือ 20/1 ทำให้เชื้อสามารถเจริญ และผลิต exo-biopolymer ได้สูงสุดเท่ากับ 27 และ 6.99 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Park *et al.*, 2001) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Kim และคณะ (2003) ซึ่งพบว่า *Cordyceps militaris* NG3 สามารถเจริญ และผลิต exo-biopolymer ได้สูงสุดเท่ากับ 22.3 และ 3.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนคือ 20/1 โดยใช้ซูโครสและน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน

4. แร่ธาตุ

อาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่จะมีธาตุเหล่านี้เป็นองค์ประกอบ คือ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม ซัลเฟอร์ คลอไรด์และธาตุอื่นๆ เช่นโคบอลต์ คอปเปอร์ เหล็ก แมงกานีส Xu และ Yun (2003) ศึกษาผลของธาตุอาหารต่อการเจริญของไมซีเลียมและการผลิต exo-biopolymer จากเชื้อรา *Auricularia polytricha* โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีธาตุอาหารต่างกันคือ $CaCl_2$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ และ $MnCl_2$ที่ความเข้มข้น 5 mM เป็นเวลา 6 วัน พบว่าเชื้อราสามารถเจริญและผลิต exo-biopolymer ได้สูงสุดเท่ากับ 6.98 และ 1.43 กรัมต่อลิตร ตามลำดับในอาหารลี้ยงเชื้อที่มี K_2HPO_4 เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Kim และคณะ (2003)

พบว่าเชื้อรา *Cordyceps militaris* C738 สามารถเจริญและผลิต exo-biopolymer ได้สูงสุดเท่ากับ 7.52 และ 1.86 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในอาหารลี้ยงเชื้อที่มี K_2HPO_4 (0.05% w/v) เป็นเวลา 5 วัน

จากผลของธาตุอาหารที่มีผลต่อการเจริญของไมซีเลียมและการผลิต exo-biopolymer จากเชื้อรา *Cordyceps militaris* โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารต่างๆกัน (w/v) ได้แก่ K_2HPO_4 (0.02-0.1), KH_2PO_4 (0.02-0.1), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$(0.02-0.1), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.01-0.05) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ K_2HPO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ คือ 0.05%, 0.05%, 0.05% และ 0.01% ตามลำดับ (Park *et al.*, 2001)

Madi และคณะ (1997) ศึกษาผลของการเติมแคลเซียมอิออนต่อการเจริญและการผลิตพูลลูแลนโดย *Aureobacidium pullulans* พบว่า การเติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.02 กก.ต่อลบ.ม. ทำให้เชื้อมีรูปร่างคล้ายยีสต์มากกว่ารา โดยแคลเซียมคลอไรด์มีผลทำให้เกิดการตกตะกอนและเปลี่ยนจากไมซีเลียมไปเป็น pellet ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร ซึ่งอาจเกิดจากความเป็นพิษแคลเซียมอิออน หรืออาจเกิดปฏิกิริยาระหว่างแคลเซียมอิออนกับประจุลบที่อยู่บนผนังเซลล์ ทำให้มีการเชื่อมกันระหว่างบริเวณผิวที่อยู่ติดกันโดย salt bridge หรือเป็นผลจากแรงผลักของประจุลบบนผนังเซลล์ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปร่างไปเป็น pellet ได้ง่ายขึ้น และการเพิ่มแคลเซียมอิออนทำให้ได้พูลลูแลนมากขึ้นจากเดิม 12.5 % (เพิ่มขึ้นจากเดิม 16 กก.ต่อลบ.ม. เป็น 18 กก.ต่อลบ.ม.) ส่วน West และ Strohfus (1997) ศึกษาผลของการเติมแมงกานีสต่อการผลิตพูลลูแลนโดย *Aureobacidium pullulans* เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเติมแมงกานีสคลอไรด์ 50 ไมโครโมล สามารถเพิ่มการผลิตพูลลูแลนจาก 11.58 กรัมต่อลิตร เป็น 13.45 กรัมต่อลิตร

2.3.2 สภาวะการลี้ยง

1. อุณหภูมิ

Xu และ Yun (2003) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของไมซีเลียมและการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อรา *Auricularia polytricha* คือ 25 องศาเซลเซียส ได้ค่าสูงสุดเท่ากับ 0.9 และ 0.7 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อรา *Cordyceps militaris* ที่เลี้ยงในอาหาร PMP medium บนเครื่องเขย่า ในช่วงอุณหภูมิ 10-30 องศาเซลเซียส คือ 20 องศาเซลเซียส ให้ค่าการเจริญและการผลิต exo-biopolymer สูงสุดเท่ากับ 1.7 และ 1.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Park *et al.*, 2001) ส่วนเชื้อรา *Cordyceps militaris* C738 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของไมซีเลียม (8 กรัมต่อลิตร) คือ 20 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต exo - biopolymer (2 กรัมต่อลิตร) คือ 25 องศาเซลเซียส (Kim *et al.*, 2003) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของไมซีเลียม และการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อรา *Phoma herbarum* CCFEE 5080 ที่เลี้ยงในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 4, 16 และ 28 องศาเซลเซียส คือ 28 องศาเซลเซียส ได้ค่าสูงสุดเท่ากับ 14.9 และ 13.6 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (Selbmann *et al.*, 2002)

2. พีเอช

เชื้อราสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช 2-10 แต่พีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4-6 พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญไม่จำเป็นต้องเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพเสมอไป เช่นเชื้อรา *Aureobasidium pullulan* การเจริญของเชื้อสูงสุดที่พีเอช 5.5 แต่ให้พอลีแซคคาไรด์สูงสุดที่พีเอช 6.5 (Badr-Eldin *et al.*, 1994 อ้างโดยวีรพันธ์ เดิมหลิ่ม, 2540) ส่วนการเลี้ยงเชื้อรา *Auricularia polytricha* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างกัน (พีเอช 3-พีเอช 9) ในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าพบว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของไมซีเลียม (8 กรัมต่อลิตร) คือ พีเอช 8 ส่วนพีเอชที่ทำให้เชื้อผลิตพอลิเมอร์สูงสุด (0.9 กรัมต่อลิตร) คือ พีเอช 5 (Xu and Yun, 2003)

พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้าง exo-biopolymer ของเชื้อ *Cordyceps militaris* ในอาหาร PMP medium คือพีเอช 6 จากการทดสอบในช่วงพีเอช 3-8 ในฟลาสก์บนเครื่องเขย่า (Park *et al.*, 2001) ส่วนเชื้อรา *Cordyceps militaris* C738 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างกัน (พีเอช 3-พีเอช 9) ในฟลาสก์บนเครื่องเขย่า พบว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของไมซีเลียม (8.1 กรัมต่อลิตร) คือ พีเอช 9 ส่วนพีเอชที่ทำให้เชื้อผลิตพอลิเมอร์สูงสุด (0.29 กรัมต่อลิตร) คือ พีเอช 6 (Kim *et al.*, 2003)

ส่วนการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus* sp. ST29 ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างกัน (พีเอช 3-พีเอช 6.5) ในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าพบว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ (20.18 กรัมต่อลิตร) และการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ (54.09 มิลลิกรัมพอลิเมอร์ชีวภาพต่อกรัมมวลชีวภาพ) คือ พีเอช 4.5 (หัสลินดา บินมะแอ, 2547)

3. อัตราการกวน

จากการทดสอบผลของอัตราการกวนต่อการผลิต Gibbs และ Sevior (1996) ศึกษาผลของอัตราการกวนในช่วง 125-1250 รอบต่อนาที ต่อการผลิตโพลีแซคคาไรด์จาก *Aureobacidium pullulans* ในการเลี้ยงเชื้อแบบกะในถังหมักขนาด 10 ลิตร อัตราการให้อากาศ 0.4 ลิตรต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 พบว่าอัตราการกวนที่ให้ปริมาณพอลิแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 11.27 กรัมต่อลิตร ที่ 250 รอบต่อนาที และอัตราการกวนที่ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 12.75 กรัมต่อลิตร ที่ 750 รอบต่อนาที แม้ว่าอัตรากวนที่สูงจะส่งเสริมการเจริญแต่ส่งผลให้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ลดลงเนื่องจากอัตราการกวนที่สูงทำลายไมซีเลียมของรา

Vashitz และ Steintuch (1989) พบว่าอัตราการกวนที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์โดยตรงกับสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนออกซิเจน เมื่อน้ำหมักมีความหนืด 100-600 มิลลิพาสคาล.วินาที หรือมีปริมาณพอลิเมอร์แซนแทน 4-18 กรัมต่อลิตร ต้องใช้อัตราการกวนเท่ากับหรือมากกว่า 500 รอบต่อนาที

4. ปริมาณออกซิเจน

Gibbs และ Sevior (1996) ผลิตโพลีแซคคาไรด์จาก *Aureobacidium pullulans* โดยเลี้ยงเชื้อแบบกะในถังหมักขนาด 10 ลิตร อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณออกซิเจนที่สะลายได้ในถังหมักลดลงอย่างรวดเร็วจนเป็นศูนย์ภายใน 20 ชั่วโมงแรกของการหมัก เนื่องจากถูกใช้ไปโดยจุลินทรีย์ ต่อมาปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในถังหมักเพิ่มขึ้นแต่ยังมีปริมาณน้อยกว่าค่าเริ่มต้น แต่ในกรณีที่ใช้อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที ปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในถังหมักมีค่าเกือบคงที่ การควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ร้อยละ 15 ตั้งแต่เริ่มการเลี้ยงจนถึง 16 ชั่วโมง ได้ผลผลิตพอลิแซคคาไรด์สูงสุด (10.25±1.07 กรัมต่อลิตร) การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนให้มีค่ามากกว่าร้อยละ 90 ที่อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที ได้ผลผลิตไมซีเลียมสูง (11.25 กรัมต่อลิตร) แต่ได้ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ต่ำ (16.37 กรัมต่อลิตร) ส่วนในกรณีที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ได้ปริมาณไมซีเลียมต่ำ (9.24 กรัมต่อลิตร) และได้ปริมาณพอลิแซคคาไรด์สูงสุด (11.27 กรัมต่อลิตร)

3. คุณลักษณะบางประการและคุณสมบัติของพอลิเมอร์ชีวภาพ

3.1 องค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมี

พอลิแซคคาไรด์เป็นพอลิเมอร์ที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก และอาจมีสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์รวมอยู่ในโครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์ (Morin, 1998) พอลิแซคคาไรด์สามารถแยกหรือสกัดได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่นแบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อรา และพืช พอลิแซคคาไรด์เกิดจากการที่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรืออนุพันธ์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่นกรดยูโรนิค หรือน้ำตาลอะมิโนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Whistler, 1969) พอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตามองค์ประกอบของพอลิเมอร์คือ

1.โฮโมพอลิแซคคาไรด์ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวในโครงสร้าง เช่น กลูแคนซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก จากการที่น้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะที่ต่างกันจึงทำให้สามารถแบ่งกลูแคนได้หลายชนิดได้แก่ scleroglucan ผลิตจากเชื้อราหลายชนิด โครงสร้างหลักของ scleroglucan ประกอบด้วยหน่วยย่อยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,3 และอาจมีส่วนแขนงที่เป็นกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1, 6 เป็นระยะๆ หรือเป็นแบบสุ่ม pullulan เป็นพอลิแซคคาไรด์พวก α-D-glucan ที่ได้จากเชื้อรา *Aureobasidium pullulans* ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1, 4 และมีพันธะ α -1,6 อยู่บ้าง พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะสายตรง pullulan ไม่ถูกย่อยโดย amylases แต่ถูกย่อยโดย

pullulanase ได้หน่วยย่อยคือ maltotriose รวมทั้ง maltotetraose (Sutherland, 1998) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีเชื้อราหลายสายพันธุ์ที่ผลิตโฮโมพอลิเมอร์กลุ่มกลูแคน (ตารางที่ 2)

2. เฮทเทอโรพอลิแซคคาไรด์ พอลิแซคคาไรด์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้อาจจะพบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่แตกต่างกันตั้ง 2 ชนิดขึ้นไป เช่น พอลิเมอร์ที่ผลิตจากเชื้อรา *Cordyceps sinensis* เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบหลักคือ น้ำตาลกาแลคโตส, อะราบิโนส และไซโลส (9.4:7.0:4.0) (Cha *et al.*, 2007) ส่วนพอลิแซคคาไรด์จาก *Cordyceps sinensis* ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส, แมนโนส และกาแลคโตส (12:0.6:0.75) (Li *et al.* 2003) นอกจากนี้ยังพบว่ามีเชื้อราหลายสายพันธุ์ที่ผลิตเฮทเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (ตารางที่ 3) แต่ในบางชนิดอาจพบน้ำตาลโมลกุลเดี่ยวต่างกันถึง 5 ชนิด ซึ่งจากองค์ประกอบที่แตกต่างกันนี้ทำให้คุณสมบัติของพอลิแซคคาไรด์แตกต่างกันไป เนื่องจากพันธะและโครงสร้างของโมเลกุลแตกต่างกัน

ตารางที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของโฮโมพอลิแซคคาไรด์

Table 2 Chemical structures of homopolysaccharide

Linkages and types	Sources	Main chain	Branch
(1 ⟶ 3)- β-d-glucan	Scleroglucan from *Sclerotium sclerotia*	(1⟶3)- β-d-glucan	(1⟶6)- β-
	An alkali-soluble glucan from *Pleurotus tuber-regium*	(1⟶3)- β-d-glucan	(1⟶6)- β-
Linear (1⟶3)- β-d-glucan	*Auricularia auricula*	(1⟶3)- β-d-glucan	-
Linear (1⟶6)- α-glucan	*Armillariella tabescents*	(1⟶6)- α -d-glucan	-
(1⟶3)- β-d-glucan with 1–2 or 1–6 branches	Pachyman *from Poria cocos*)	(1⟶3)- β-d-glucan	(1⟶2)- β- or (1⟶6)- β-
(1⟶3)- α -glucan	*Armillariella tabescens*	(1⟶3)- α -glucan	-
(1⟶4)- α -; (1⟶6)- β-glucan	*Agricus blazei*	(1⟶6)- β-d-glucan	(1⟶4)- α -

ที่มา : Zhang และคณะ (2006)

ตารางที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของเฮทเทอโรพอลิแซคคาไรด์

Table 3 Chemical structures of heteropolysaccharides

Polysaccharide	Linkages and types	Sources	Main chain	Branch
Heteroglucans	(1⟶3)- β-glucuronoglucan	*Ganoderma lucidum*	(1⟶3)- β-glucuronoglucan	Glucuronic acid
	Xyloglucan	*Grifola frondosa*	Glucan	Xylose
	Arabinoglucan	*Ganoderma tsugae*	Glucan	Arabinose
	Riboglucan	*Agricus blazei*	Glucan	Ribose
	Galactomannoglucan	*Hohenbuehelia serotina*	Glucan	Galactose and mannose
	Galactoxyloglucan	*Hericium erinaceus*	Glucan	Galactose and xylose
	Mannoxyloglucan	*Grifolan frondosa*	Glucan	Mannose and xylose
	Xylogalactoglucan	*Inonotus obliquus*	Glucan	Xylose, galactose
Heterogalactan	Glucogalactan	*Ganoderma teugae*	Galactan	Glucose
	Arabinogalactan	*Pleurotus citrinopileatus*	Galactan	Arabinose
	Fucogalactan	*Sarcodon aspratus*	Galactan	Fucose
	Mannogalactan	*Pleurotus pulmonarius*	Galactan	Mannose

ตารางที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของเฮทเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (ต่อ)

Table 3 Chemical structures of heteropolysaccharides (Cont.)

Polysaccharide	Linkages and types	Sources	Main chain	Branch
Other heteroglycans	Fucomannogalactan	*Grifola frondosa*	Galactose	Fucose mannose
	Glucoxylan		Xylan	Glucose
	Mannogalactofucan	*Grifola frondosa*	Fucan	Mannose and galactose
	Mannoglucoxylan	*Hericium erinaceus*	Xylose	Mannose, glucose
	(1⟶3)-α-mannan	*Dictyophora indusiata*	(1⟶3)-α-mannan	-
	Glucomannan (1⟶2)-β-; (1⟶3)-β-glucomannan	*Agricus blazei*	Mannan (1⟶3)-β-linked mannose	Glucose (1⟶2)-β-glucan

ที่มา : Zhang และคณะ (2006)

3.2 น้ำหนักโมเลกุล

พอลิเมอร์จัดเป็นสารพอลิดิสเพอร์ส (polydisperse) กล่าวคือ พอลิเมอร์ชนิดเดียวกันมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันหรือมีโมเลกุลที่มีความยาวโซ่ยาวและสั้นต่างกันผสมอยู่ ทั้งนี้เป็นเพราะกระบวนการในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ ทำให้โอกาสที่ได้โมเลกุลที่มีความยาวโซ่เท่ากัน (น้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน) นั้นเป็นศูนย์ ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลทั่วไปจึงระบุเป็นค่าเฉลี่ย และเนื่องจากพอลิเมอร์เป็นสารพอลิดิสเพอร์ส ดังนั้นจึงระบุค่า polydispersity idex (M_w /M_n) เพื่อบอกค่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลด้วย ซึ่งสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลเพียงค่าเดียวจะมีการการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1 (ชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์, 2526) การหาน้ำหนักโมเลกุลด้วย GPC นั้น โมเลกุลของสารจะถูกแยกออกตามขนาดของโมเลกุล พอลิเมอร์จะละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งจะเป็นตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ไหลผ่านคอลัมน์ เมื่อฉีดสารละลายพอลิเมอร์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.1-2 % โดยน้ำหนักเข้าไปในระบบ ตัวทำละลายจะพาพอลิเมอร์ให้ไหลผ่านเข้าคอลัมน์ ซึ่งภายในบรรจุ microporous gel particle สารที่มีโมเลกุลเล็กจะไหลเข้าไปในรูพรุน

ของเจล ซึ่งใช้เวลานานในการที่ตัวทำละลายจะชะล้างออกจากรูพรุน ส่วนโมเลกุลใหญ่จะไหลออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า เนื่องจากไม่สามารถไหลเข้าไปในรูพรุนของเจลได้ เวลาหรือปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการชะล้าง เป็นปฏิภาคกลับกับขนาดของโมเลกุล ค่าน้ำหนักโมเลกุลคำนวณจาก GPC Curve ของสารมาตรฐาน และทำ calibration cuvē เพื่อให้ได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกับค่าแท้จริงมากที่สุด (จินตนา ลีกิจวัฒน์, 2539)

พอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์เป็นพอลิเมอร์ที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลสูงมากโดยมีค่าน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 50,000 ดาลตันถึงมากกว่า 1 ล้านกิโลดาลตัน (Weiner, 1997 อ้างโดยรพีพรรณ เติมตัณฑ์ 2547) เช่นพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *c. sinensis* 16 มีค่าน้ำนักโมเลกุล 126 kDa (Cha *et al.*, 2007) ส่วนสเคอโรกลูแคนและพูลลูแลนมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1.3×10^5-6.0×10^6 ดาลตัน และ 10^3-10^7 ดาลตัน ตามลำดับ (Sutherland, 1998) ส่วนพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อรา *Phoma herbarum* CCFEE 5080 และ *Botryosphaeria* sp. มีน้ำหนักโมเลกุล 7.412×10^6 ดาลตัน และ 4.875×10^6 ดาลตัน ตามลำดับ (Selbmann *et al.*, 2003, Aneli *et al.*, 2003)

3.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพ

Polysaccharides หลายชนิดที่ผลิตจากเชื้อรามีคุณสมบัติทางชีวภาพ และทางเภสัชวิทยา (ตารางที่ 4) เช่น เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการรักษาโรคที่เกิดจากไวรัสในมนุษย์ เช่น herpatis, hypertension, hypercholesterolaemia และ gastric cancer (Park *et al.*, 2001) พอลิแซคคาไรด์ผลิตจากเชื้อราแมลง *Cordyceps* species มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น immuuunomodulating activity, hypoglycaemc, hypocholesterolemic และ antitumor activities (Xiao *et al.*, 2004) ตัวอย่างของพอลิเมอร์จากเชื้อราแมลงที่มีคุณสมบัติทางการแพทย์และเภสัชวิทยา เช่นพอลิแซคคาไรด์ (CS-F30) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นใย *Cordyceps sinensis* ในอาหารเหลวมีคุณสมบัติช่วยลดระดับ cholesterol ในเลือด, ยับยั้งการเกิดเนื้องอก (Chen *et al.*, 1997), พอลิเมอร์จากเชื้อรา *Paeciloyces* เช่น *Paeciloyces japonica* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและลดระดับน้ำตาลในเลือด (Bae *et al.*, 2000) นอกจากนี้กลูแคนจากเชื้อราหลายชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ (anti microbial) ยับยั้งไวรัส (anti-virus) (Sutherland, 1998) พอลิเมอร์จาก *Fusarium coccophilum* BCC2415 แสดงคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อรา (*Candida albicans*) และยับยั้งเซลล์มะเร็ง (NCI-H187) นอกจากนี้พอลิเมอร์จาก *Cookenia tricholoma* BCC2468, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 และ *Zygosporium masonii* BCC7543 มีคุณสมบัติในการยับยั้งไวรัส (herpes simplex virus type 1 : HSV-1) (Madla *et al.*, 2004)

ตารางที่ 4 ชนิดและฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิเมอร์จากเชื้อรา

Table 4 Sources, types and bioactivity of polysaccharides from fungi

Fungi source	Polysaccharide source	Type	Main bioactivity
Pleurotus tuber-regium	Sclerotium, mycelium	β-d-glucan	Hepato-protective, anti-breast cancer
Ganoderma lucidum	Fruiting body, culture broth	Heteroglycan, mannoglucan, glycopeptide	Hyperglycemia, immunomodulating, antitumor, antioxidative, anti-decrepitude
Auricularia auricula	Fruiting body	Glucan	Hyperglycemia, immunomodulating, antitumor, antiflammatory, antiradiative
Schizophyllum commune	Mycelium	Glucan, schizophyllan	Antitumor
Hericum erinaceus	Fruiting body, mycelium	Heteroglycan, hetero-glycanpeptide	Hyperglycemia, immunomodulating, antitumor
Lentinus edodes	Culture broth, fruiting body	Mannoglucan, polysaccharide–protein complex, glucan, lentinan	Immunomodulating, antitumor, antiviral
Sclerotinia sclerotiorum	Sclerotium	Glucan, scleroglucan (SSG)	Antitumor
Polystictus versicolar	Fruiting body, culture broth, mycelium	Heteroglycan, glycopeptide, krestin (PSK)	Immunomodulating, antitumor, antiradiative, hyperglycemia, antiflammatory
Grifola frondosa	Fruiting body	Proteoglycan, glucan, galatomannan, heteroglycan, grifolan	Immunomodulating, antitumor, antiviral, hepatoprotective
Inonotus obliquus	Fruiting body, mycelium	Glucan	Antitumor, immunomodulating

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

ตารางที่ 4 ชนิดและฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิเมอร์จากเชื้อรา (ต่อ)

Table 4 Sources, types and bioactivity of polysaccharides from fungi (Cont.)

Fungi source	Polysaccharide source	Type	Main bioactivity
Agaricus blazei	Fruiting body, mycelium	Glucan, heteroglycan, glucan protein, Glucomannan–protein complex	Antitumor
Flammulina velutipes	Fruiting body, mycelium	Glucan–protein complex, glycoprotein	Antitumor, antiflammatory, antiviral, immunomodulating
Ganoderma applanatum	Fruiting body	Glucan	Antitumor
Polypours umbellatus	Mycelium	Glucan	Antitumor, immunomodulating
Clitopilus caespitosus	Fruiting body	Glucan	Antitumor
Pleurotus citrinopileatus	Fruiting body	Galactomannan	Antitumor
Trametes robiniophila	Mycelium	Proteoglycan	Immunomodulating, hepatoprotective, anticancer
Tremella fuciformis	Fruiting body, mycelium, culture broth	Heteroglycan	Hyperlipidemia, hyperglycemia, immunomodulating, antitumor, anti-decrepitude, anti-thrombus
Tremella aurantialba	Fruiting body, mycelium	Heteroglycan	Immunomodulating, hyperglycemia
Pleurotus ostreatus	Fruiting body	Glycoprotein	Antitumor, hyperglycemia, antioxidant
Morchella esculenta	Fruiting body	Heteroglycan	Hyperglycemia, antitumor

ตารางที่ 4 ชนิดและฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิเมอร์จากเชื้อรา (ต่อ)

Table 4 Sources, types and bioactivity of polysaccharides from fungi (Cont.)

Fungi source	Polysaccharide source	Type	Main bioactivity
Omphalia lapidescens	Fruiting body	Glucan	Antiflammatory, immunomodulating
Phellinus linteus	Fruiting body	Glucan	Antitumor
Armillariella tabescens	Mycelium	Heteroglycan	Antitumor
Dictyophora indusiata	Fruiting body	Heteroglycan, mannan, glucan	Antitumor, hyperlipidemia
Peziza vericulosa	Fruiting body	Proteoglycan, glucan	Immunomodulating, antitumor
Tricholoma mongolium	Fruiting body	Glucan	Antitumor
Cordyceps sp	Fruiting body, mycelium, culture broth	Glucan, heteroglycan	Antitumor, immunomodulating, antitumor, heperglycemia

ที่มา : Zhang และคณะ (2006)

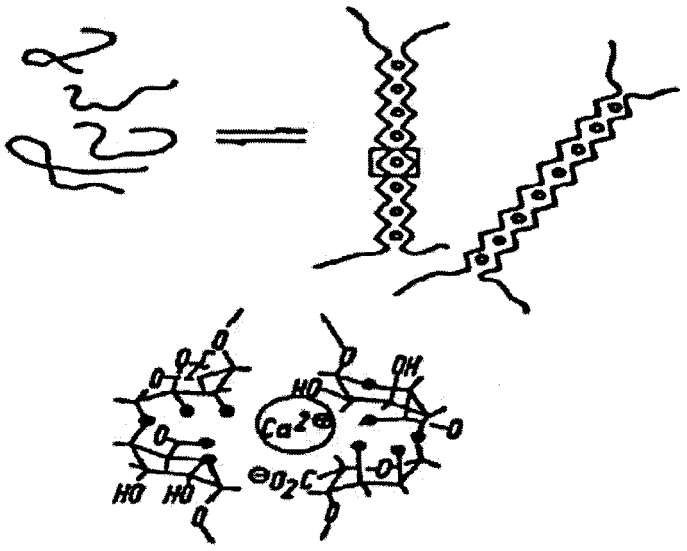
3.4 การเกิดเจล (Gel formation)

เจลจัดเป็นวัฏภาคที่มีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างของแข็งและของเหลว โครงสร้างของเจลเกิดจากโมเลกุลของสายโซ่พอลิเมอร์จับกันด้วยพันธะชนิดต่างๆ เป็นโครงร่างตาข่ายสามมิติที่สามารถจับกับน้ำหรือสารอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำไว้ภายในได้ เจลเป็นผลมาจากกระบวนการที่ประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากการทำปฏิกิริยาระหว่างพอลิเมอร์กับน้ำ ความหนืดของระบบจะเพิ่มขึ้น ขนาดของพอลิเมอร์จะใหญ่ขึ้นเป็นผลมาจากการคลายตัว จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนที่สอง คือ พอลิเมอร์ที่คลายตัวหรือโมเลกุลที่คลายตัวอย่างสมบูรณ์แล้ว จะรวมตัวหรือจับกันอย่างช้าๆ เพื่อเกิดเป็นโครงร่างตาข่าย ความหนืดของระบบจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อพิจารณาการเกิดพันธะระหว่างโมเลกุลจำนวนพันธะที่เกิดขึ้นต้องไม่น้อยกว่า 3 พันธะ โดยอันตกิริยาภายใน (interaction) ระหว่างโมเลกุล ได้แก่ แรงวันเดอร์วาล พันธะไฮโดรเจน แรงขั้วไฟฟ้า และอันตรกิริยาระหว่างหมู่ไม่ชอบน้ำ (Vashuk *et al.*, 2001)

ลักษณะของการเกิดเจลที่มีรูปร่างแน่นอน และเป็นชนิดโครงสร้างสามมิติที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ เจลลักษณะนี้อาจสามารถจัดแบ่งเป็นเจลชนิดที่เรียกว่าไฮโดรเจล ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษได้แก่เมื่ออยู่ในน้ำที่มีจำนวนมาก พอลิเมอร์นี้จะมีการพองตัวและสามารถยึดน้ำเอาไว้ในโครงสร้างที่มีการพองตัวได้ สารเหล่านี้จะไม่ละลายน้ำแต่จะคงรักษาสภาพที่เป็น three dimention networks ไว้โดยมากจะเป็นสารในกลุ่ม hydrophilic polymer molecules มีการ cross-linked ด้วยพันธะทางเคมีหรือพันธะอื่นๆ ส่วนประกอบที่ทำให้เกิดไฮโดรเจลมี 2 อย่างขึ้นไป คือ โครงสร้างของไฮโดรเจลที่มีการครอสลิงค์แบบสามมิติ และมีส่วนของน้ำซึ่งจะเข้าไปอยู่ระหว่างในช่องว่างของพอลิเมอร์โมเลกุลแน่นจึงทำให้เกิดไฮโดรเจล ซึ่งโครงสร้างที่เกิดพันธะได้มีหลายลักษณะไฮโดรเจลมีความสามารถในการดูดน้ำได้ดีมีลักษณะคล้ายกับเยลลี่ ไฮโดรเจลชอบน้ำเพราะมีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) และคาร์บอกซิล (COOH) และโครงสร้างที่มีการครอสลิงค์เป็นตาข่ายจึงช่วยในการจับน้ำและดูดซึมน้ำเก็บเอาไว้ คุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่นำมาใช้ควรเป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างเป็นแบบอสัณฐาน เพราะโครงสร้างอสัณฐานมีช่องว่างในโครงสร้างมาก จึงทำให้น้ำเข้าไปแทรกได้ดีซึ่งจะทำให้พอลิเมอร์นั้นเกิดการบวมและขยายตัวออกมาเป็นเจลเปียก ซึ่งสัดส่วนของน้ำจะมากกว่าพอลิเมอร์ ไฮโดรเจลโดยทั่วไปสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ประเภทแรกเป็นไฮโดรเจลที่ได้จากกระบวนการทางฟิสิกส์หรือที่เรียกว่าเจลเทียม เกิดจากแรงยึดเหนี่ยวระหว่างพันธะเจลที่ได้นี้มักมีจุดหลอมเหลวสูง ส่วนประเภทที่สองได้จากกระบวนการทางเคมีซึ่งมักจะใส่สารที่ทำให้เกิดการครอสลิงค์ลงไป (Rosiak and Ulanski, 1999)

พอลิเมอร์ชีวภาพหลายชนิดมีคุณสมบัติการเกิดเจล เนื่องจากพอลิเมอร์เหล่านี้มีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่และสามารถละลายน้ำได้ เช่น pullulan จากเชื้อ *Aureobasidium pullulans*, Xanthan จากเชื้อ *Xanthomonas compestris* และ cellulose จาก *Acetobactor xylinium* เป็นต้น (Sutherland, 1998)

การเกิดเจลนั้นบางครั้งต้องเติมสารประกอบบางชนิดเช่นไอออน เพื่อให้เกิดลักษณะของโครงร่างตาข่ายสามมิติ เช่น อัลจิเนต เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีความไวจำเพาะเจาะจงสูง (high affinity) ต่อสารที่มีประจุ+2 โดยพบว่าอัลจิเนตสามารถฟอร์มตัวเป็นเจลได้เมื่อมีการเติมสารประจุ +2 (Ca^{2+}) แต่จะไม่เกิดเจลเมื่อเติมสารประจุ +1 โครงสร้างของเจลมีลักษณะคล้ายกล่องไข่ (egg box) โดยมี Ca^{2+} เกาะอยู่กับสายโพลิเมอร์ (ภาพที่ 2) คุณสมบัติที่ดีของอัลจิเนตคือ ทำให้เกิด Irreversible gel ในน้ำเย็นเมื่อมี Ca^{2+} รวมอยู่ด้วย (คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 2550) และนอกจากนี้จากรายงานของ Dermlim (1999) พบว่าพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อ *Enterobactor cloacae* WD7 สามารถฟอร์มเจลในสภาวะที่เป็นด่างโดยเจลจะมีความแข็งแรงมากที่สุดเมื่อมีการเติม $CuSO_4$



ภาพที่ 2 กลไกการเกิดเจลของ calcium alginate (Egg-box model)

Figure 2 Machanism of gel formation from calcium alginate (Egg-box model)

ที่มา: คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (2550)

3.5 การเกิดฟิล์ม (Film formation)

ฟิล์มมีองค์ประกอบหลักคือพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งมีคุณสมบัติเกิดฟิล์มได้ ตัวทำละลายและสารเจือปนซึ่งเติมลงไปเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของฟิล์ม ในการเตรียมฟิล์มมีแรง 2 แรงได้แก่ แรงโคฮีชัน (cohesion) เป็นแรงระหว่างพอลิเมอร์ด้วยกันเอง จะเกิดขึ้นระหว่างการเกิดฟิล์ม ทำให้เกิดการเชื่อมตัวของผิววัตถุเดียวกันสร้างพันธะที่แข็งแรง ซึ่งจะช่วยป้องกันหรือต้านทานการแยกออกจากกัน ปัจจัยที่มีผลต่อแรงโคฮีชันได้แก่ โครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของพอลิเมอร์ ระบบการละลายและสภาวะในการเตรียมฟิล์ม โดยแรงโคฮีชันมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุล ความสม่ำเสมอของโครงสร้างสายโซ่ การแผ่กิ่งก้านสาขา และการกระจายของกลุ่มที่มีขั้วบนสายพอลิเมอร์ คือสายพอลิเมอร์ที่ยาวจะทำให้เกิดการยึดเกาะกันได้ดี การกระจายของกลุ่มขั้วอย่างมีระเบียบในสายพอลิเมอร์จะช่วยให้เกิดพันธะไฮโดรเจน และพันธะไอออนิกระหว่างสายโซ่ ทำให้มีความแข็งแรง การละลายของพอลิเมอร์ในการเตรียมฟิล์มยังมีผลต่อแรงโคฮีชัน คือถ้าโมเลกุลของพอลิเมอร์ละลายหรือขยายตัวได้มากที่สุด จะได้โครงสร้างซึ่งเชื่อมกันด้วยแรงโคฮีชันที่มากฟิล์มที่ได้มีความแข็งแรง ส่วนแรงอีกชนิดหนึ่งคือแรงแอดฮีชัน (adhesion) เป็นแรงระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์กับสารอื่นที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมฟิล์ม ทำให้เกิดโครงร่าง

ของฟิล์มได้ เช่น แรงระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์กับพลาสติไซเซอร์ ซึ่งจะมีผลต่อคุณสมบัติต่างๆของฟิล์มเช่นกัน สารที่ใช้เป็นพลาสติไซเซอร์ควรเป็นสารที่ไม่ระเหยง่าย มีจุดเดือดสูงและไม่เกิดการแยกตัวภายหลังการเติม ดังนั้นพลาสติไซเซอร์ที่เลือกใช้ควรเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ความดันไอต่ำ และอัตราการแพร่ต่ำ เพื่อป้องกันการแยกตัวออกขณะระเหยตัวทำละลายออกจากสารละลายพอลิเมอร์ นอกจากนี้ที่สำคัญ คือ พลาสติไซเซอร์ที่นำมาเติมในสารละลายพอลิเมอร์จะต้องละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายพอลิเมอร์นั้น (Babker, 1996 อ้างโดยพรระวี สุมิตร, 2547)

Kim และคณะ (2002) ได้ศึกษาสมบัติเชิงกล (ความทนแรงดึง, เปอร์เซ็นต์การยืดตัว) การซึมผ่านของไอน้ำ และการละลายของฟิล์มจากแป้งที่มีคาร์บอกซิลิกสูง โดยใช้พลาสติไซเซอร์ คือ ซอร์บิทอล ไซลิทอล แมนนิทอล และกลีเซอรอล พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ซอร์บิทอล ไซลิทอล แมนนิทอล ทำให้ความทนแรงดึงและเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของฟิล์มเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไซลิทอล แมนนิทอล และกลีเซอรอล ทำให้ค่าการซึมผ่านของไอน้ำลดลง การเพิ่มความเข้มข้นของพลาสติไซเซอร์ทำให้ค่าการละลายของฟิล์มลดลง นอกจากนี้ Xiao และคณะ (2000) ได้ทำการผสมไคโตซานกับแป้งบุกแล้วทำการหล่อฟิล์ม เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติเชิงกล และความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มไคโตซาน พบว่า อัตราส่วนของฟิล์มไคโตซานกับแป้งบุกที่ 7:3 สามารถผสมเข้ากันได้ดีที่สุด และแผ่นฟิล์มที่ได้มีความใสรวมทั้งยังมีสมบัติทางความร้อน (Thermal properties) ค่าความแข็งแรง (Tensile strength) และค่าการยืด ณ จุดขาด (Elongation at break) สูงที่สุดด้วย เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่อะมิโนของไคโตซานกับหมู่ไฮโดรเจนของแป้งบุก และยังพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณแป้งบุกฟิล์มที่ได้จะละลายน้ำได้ดีขึ้น

4. การประยุกต์ใช้พอลิเมอร์

จากแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ องค์ประกอบของพอลิเมอร์ น้ำหนักโมเลกุล และโครงสร้าง สิ่งเหล่านี้มีอิทธิพลต่อคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่แสดงออกมา (Tallon *et al.*, 2003) จากคุณสมบัติของพอลิเมอร์จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆมากมายที่สำคัญคือ ทางเภสัชกรรมและการแพทย์

โดยทั่วไปพอลิเมอร์ในตำรับยาจะเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเตรียมให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะข้นหนืดด้วยเหตุผล คือ ให้มีลักษณะที่ดี เพื่อเพิ่มความคงตัว และปรับให้สามารถใช้ได้ตามที่ต้องการ (สุวรรณี พนมสุข, 2546) พอลิเมอร์ที่นิยมใช้ในทางเภสัชกรรมนั้นมีมากมายทั้งที่ใช้เป็นตัวยาสำคัญ (Active ingredients) เป็นส่วนประกอบในตำรับ (Pharmaceutical Necessities) (ตารางที่ 5) หรือใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ พอลิเมอร์ที่นิยมใช้ในทางเภสัชกรรมเช่นไดติน

ไคโตแซน เด็กซ์แตรน เพคติน โดยส่วนมากนำมาใช้เป็นสารช่วยในตำรับต่างๆ โดยเป็นสารช่วยควบคุมการปลดปล่อยยาหรือให้ตัวยาออกฤทธิ์นาน สารก่อฟิล์ม สารก่อเจลบางตำรับสามารถทำให้ตัวยาละลายหรือแตกตัวได้ดีขึ้น รวมทั้งในระบบนำส่งยาแบบใหม่ ได้แก่ระบบนำส่งยาผ่านทาง จมูก ตา ผิวหนังและระบบนำส่งยาสู่เป้าหมายโดยเตรียมในระดับอนุภาคขนาดเล็ก เช่น microspheres, nanoparticle เป็นต้นการเตรียมเป็น Bioadhesive เพื่อใช้ติดกับเนื้อเยื่อในสารต่างๆของร่างกาย (จุไรรัตน์ นันทานิช, 2546)

ตารางที่ 5 หน้าที่ของพอลิเมอร์ (Pharmaceutical Necessities) ในรูปแบบยาเตรียมต่างๆ

Table 5 Pharmaceutical Necessities on dosage forms

Dosage forms	หน้าที่ของพอลิเมอร์
Solid dosage forms Tablets, Capsules	Binder, Disintegrant, Diluent, Filler
Semisolid dosage forms	Gel forming agent, Suspending agent, Viscosity inducing agent
Solution	Viscosity inducing agent

ที่มา : สุวรรณี พนมสุข (2546)

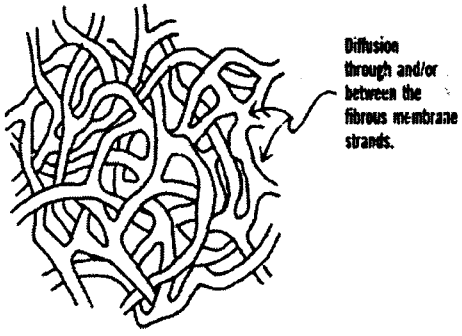
4.1 การประยุกต์ใช้พอลิเมอร์เพื่อนำส่งยา

ระบบนำส่งยาเป็นเครื่องมือสำคัญทางเภสัชกรรม อัตราเร็วในการปลดปล่อยยา ปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยและระยะเวลาในการปลดปล่อยยา ถูกควบคุมโดยคุณสมบัติทางกายภาพของตัวยา เช่น การแบ่งภาคและการแพร่ของตัวยา และการกร่อนของพอลิเมอร์ คุณสมบัติเหล่านี้ถูกนำมาออกแบบระบบควบคุมการปลดปล่อยยา ซึ่งอาจเป็นระบบเมทริกซ์ (matrix device) ซึ่งประกอบด้วยตัวยาละลายหรือกระจายอยู่ในพอลิเมอร์ หรือ reservoir devices โดยอาศัย porous หรือ nonporous membrane รูปแบบเภสัชภัณฑ์เหล่านี้สามารถใช้เป็นระบบควบคุมการปลดปล่อยตัวยาหรือใช้เป็นระบบนำส่งยาสู่เป้าหมาย การพัฒนาระบบนำส่งยาเพื่อให้ยามีการออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพดีนั้นจะมีเทคนิคในการเตรียมยาในรูปแบบแตกต่างกันออกไป แต่จุดสำคัญในการพัฒนามักต้องการให้ยาปลดปล่อย (release) เป็นแบบ zero order kinetic ซึ่งเป็นระบบการปลดปล่อยยาคงที่ เทคนิคต่างๆต้องอาศัยตัวพา (carrier) ที่เหมาะสมในการนำส่งยาเหล่านั้นซึ่งสารที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ hydrogel และได้มีการพัฒนา hydrogel เพื่อนำมาใช้ในด้านการควบคุมการปลดปล่อยตัวยากันแพร่หลาย (สมลักษณ์ คงเมือง, 2546)

การศึกษาการปลดปล่อยและการซึมผ่านผิวหนังจำลองของยาเตรียม (methrimazole) สำหรับนำส่งยาผ่านผิวหนัง โดยเตรียมในรูปฟิล์มเมทริกซ์ ซึ่งเตรียมจากพอลิเมอร์จากธรรมชาติ ได้แก่ ไคโตแซน พอลิเมอร์สังเคราะห์ได้แก่ยูราจิต และส่วนผสมของพอลิเมอร์ทั้งสองในอัตราส่วนต่างๆ กัน (1:10, 1:20 และ 1:30) พบว่าการปลดปล่อยยาจากแผ่นฟิล์มไคโตแซนและฟิล์มที่มีส่วนผสมของไคโตแซนในอัตราส่วนที่สูงจะเป็นไปอย่างรวดเร็วภายใน 30 นาทีแรกจากนั้นการปลดปล่อยยาจะช้าลง โดยตัวยาจะถูกปลดปล่อยออกมามากกว่าร้อยละ 60 ภายในเวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่ฟิล์มยูราจิตจะมีการปลดปล่อยยาช้าที่สุดและปริมาณยาที่ปลดปล่อยต่ำกว่าร้อยละ 60 ภายใน 12 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบการซึมผ่านผิวหนังของยาแบบภายนอกร่างกายผ่านคราบงูในตัวกลางพีเอช 7.4 phosphate buffer ที่เวลาต่างๆกัน พบว่ายามีการซึมผ่านเพียง 1-2% ภายใน 12 ชั่วโมง (สุชาดา วรรณชนะ 2545) การตรียมยาในรูปแบบฟิล์มมีข้อดี คือ ตัวยาคงตัวดีและเตรียมได้ง่าย และอาจใช้ประโยชน์กับยาที่ก่ออาการข้างเคียงกับทางเดินอาหาร (จุไรรัตน์ นันทานิช, 2546) เช่นการเตรียมแผ่นฟิล์มยาคลินดามัยซิน (Clindamycin) ซึ่งเป็นยาที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรีย ยาที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันคือ แบบยาฉีด ยาเม็ด และครีมทาผิวหนัง ปัญหาที่พบมาก คือ ปริมาณยาในกระแสเลือดและที่ผิวหนังนั้นไม่แน่นอน ควบคุมให้เหมาะสมได้ยาก ทำให้ต้องรับประทานยาหรือทายาหลายครั้งต่อวัน ดังนั้นการพัฒนารูปแบบยานี้ขึ้นมาในรูปแบบแผ่นฟิล์มปิดผิวหนังโดยนำแผ่นฟิล์มมาผสมกับตัวยา เป็นการรักษาเฉพาะที่ ช่วยให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น ลดการกินยาซึ่งอาจเกิดอาการข้างเคียงได้ และมีข้อดีกว่ารูปแบบอื่นๆ คือ ขจัดปัญหาในกรณีที่ยามีผลต่อกระเพาะอาหารและยาที่ต้องผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงยาที่ตับ เพิ่มความสะดวกสบายให้ผู้ป่วย และถ้าต้องการหยุดยาสามารถกำจัดออกได้ง่าย นอกจากนี้ข้อดีของการเตรียมในรูปแบบฟิล์มคือ ตัวยาคงตัวดีและเตรียมได้ง่าย (มณทินี คงสวัสดิ์ศักดิ์, 2546)

จากการศึกษาผลของอัตราส่วนของไฮดรอกซีเมทิลเซลลูโลส (HPMC) ต่อยา และขนาดอนุภาคของยาทั้งหมดต่ออัตราการปลดปล่อยยาโพรพราโนลอล 160 มิลลิกรัม และอะมิโนฟิลลิน 225 มิลลิกรัม ออกจากยาเม็ดเมทริกซ์ออกฤทธิ์นานที่เตรียมโดยใช้ไฮดรอกซีเมทิลเซลลูโลส 4 ชนิดคือ HPMC K4M, K15M และ K100M พบว่าร้อยละของยาที่ละลายออกมามีความสัมพันธ์กับรากที่สองของเวลาเป็นเส้นตรง เมื่อเปรียบเทียบอัตราการปลดปล่อยยาออกจากยาเม็ดที่เตรียมโดยใช้ HPMC K4M, K15M และ K100M อัตราส่วนของ HPMC ต่อยาเท่ากัน พบว่ามีอัตราการปลดปล่อยยาใกล้เคียงกันมาก ในขณะที่ HPMC K100 ซึ่งมีความหนืดต่ำที่สุดมีอัตราการปลดปล่อยยาเร็วกว่าทั้ง 3 ชนิดที่กล่าวมา โดยได้สรุปปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่มีผลต่ออัตราการปลดปล่อยยาคือ อัตราส่วนของ HPMC ต่อยาโดยเมื่อปริมาณ HPMC เพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้อัตราการปลดปล่อยยาลดลง ความแตกต่างของขนาดอนุภาคยาโพรพราโนลอล และยาอะมิโนฟิลลินไม่มีผลต่อการปลดปล่อยยาอย่างมีนัยสำคัญ (Eord *et al.*, 1985 อ้างโดย เพ็ญนภา ภูวฤทธิ์, 2547) สำหรับกลไกการปลดปล่อย

ยาพบว่า เมื่อของเหลวตัวกลางซึมผ่านเข้าสู่ยาเม็ดเมทริกซ์ บริเวณผิวนอกของเนื้อเมทริกซ์จะเริ่มเปียกน้ำ ดูดน้ำและพองตัวเป็นเจลก่อน โดยพอลิเมอร์ที่คลายตัวจะมีลักษณะเป็นตาข่าย (ภาพที่ 3) ตัวยาที่แทรกอยู่ในเนื้อเมทริกซ์บริเวณผิวนอกของชั้นเจลจะถูกปลดปล่อยออกมาก่อน โดยมักแพร่ผ่านชั้นเจลหรือผ่านเนื้อเมทริกซ์สู่สารละลายตัวกลางซึ่งอยู่ภายนอกพร้อมทั้งมีการกร่อนละลายของเมทริกซ์ที่พองตัว นอกจากนี้ยังมีการแพร่ผ่านช่องทางซึ่งเป็นรูพรุนของร่างแหพอลิเมอร์ด้วย (Wan *et al.*, 1991)



ภาพที่ 3 แสดงช่องทางบนร่างแหพอลิเมอร์สำหรับให้สารเคลื่อนที่ผ่าน

Figure 3 Diffusion throught between fibrous membrane strdnds

ที่มา: Martin และคณะ (1993)

4.2 การใช้เป็นสารช่วยในยาเม็ด เช่น ใช้เป็นสารเจือจางในการตอกโดยตรง สารช่วยยึดเกาะและสารช่วยแตกตัวในยาเม็ด การศึกษาของ Sawayanaki และคณะ (1982) พบว่าสามารถใช้สารไคตินและไคโตแซนเป็นสารเพิ่มปริมาณในการเตรียมยาเม็ดที่เตรียมโดยวิธีการตอกโดยตรง โดยสารผสมของไคตินและไคโตแซนมีคุณสมบัติในการไหลและการหล่อลื่น และสามารถตอกได้ยาเม็ดที่มีความแข็งมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารผสมของคริสทัลลีน เซลลูโลส

4.3 การเตรียมเป็น Bioadhesive เพื่อใช้ติดกับเนื้อเยื่อในสารต่างๆของร่างกาย พอลิเมอร์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวยึดเกาะกับผิวหนังนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นชั้นที่สัมผัสกับผิวหนังโดยตรง ดังนั้นพอลิเมอร์ต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ ไม่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองหรือการแพ้ระหว่างการสัมผัสกับผิวหนัง ให้ประสิทธิภาพในการยึดเกาะที่พอเหมาะกับผิวหนัง สามารถแกะออกได้ง่ายและไม่ทิ้งองค์ประกอบที่ล้างออกไม่ได้ที่ผิวหนัง และการรักษาความคงตัวทางเคมีและทางกายภาพของตำรับสำหรับพอลิเมอร์ที่ใช้การเกาะติด (adhesive polymer) อาจทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยตัวยาแบบเมทริกซ์โดยตรงได้ โดยกระจายตัวยาอย่างสม่ำเสมอในตัวพอลิเมอร์

เมทริกซ์ และนำไปเตรียมเป็นระบบนำส่งยาทางผิวหนังโดยระเหยตัวทำละลายออก ในการเตรียมมีหลายขั้นตอนที่มีผลกระทบต่อขบวนการนำส่งยาที่ใช้ในระบบนี้ เช่น การละลายของตัวยาในพอลิเมอร์เมทริกซ์ การแพร่ของโมเลกุลของตัวยาจากเมทริกซ์เข้าสู่ผิวหนัง

นอกจากนี้ยังประยุกต์ใช้ในการเตรียมตำรับออกฤทธิ์นานโดยระบบเมทริกซ์ เช่นใช้เป็นสารก่อเจล เคลือบแกรนูลเพื่อให้ยาออกฤทธิ์นาน เตรียมเป็นฟิล์มที่ประกอบด้วยตัวยาในฟิล์ม เตรียมเป็นแกรนูลที่ลอยได้ และช่วยป้องกันยาจากการทำลายด้วยกรดในกระเพาะ ซึ่งการนำพอลิเมอร์ไปใช้ประโยชน์ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของพอลิเมอร์เป็นสำคัญ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 การประยุกต์ใช้พอลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์

Table 6 Establisher applications of microbial polysaccharide

Property	Use	Polymer
Biological : properties	Antitumer agents	β-D-Glucans
	Eye and joint surgery	Hyaluronic acid (*Streptococcus* EPS)
	Heparin analogues	*Escherichia coli* K5 EPS
	Wound dressings	Bacterial cellulose
Chemical properties :	Enzyme substrates	*Escherichia coli* K4 and K5 EPS
	Oligosaccharide preparation	Curdlan, pullulan, scleroglucan
Physical properties :		
Emulsion stabilization	Foods, thixotropic paints	Xanthan
Fiber strength	Acoustic membranes	Bacterial cellulose
Film formation	Food coatings	Pullulan
Flocculants	Water clarification ore extraction	Various
Foam stabilization	Beer, fire-fighting fluids	Xanthan
Gelling agents	Cell and enzyme technology	Gellan
	Foods	Curdlan, gellan
	Oil recovery	Curdlan, xanthan
Hydrating agents	Cosmetics, pharmaceuticals	Hyaluronic acid
Inhibitor of crystal formation	Frozen foods, pastilles and sugar syrups	Xanthan Xanthan
Shear thinning and viscosity control	Oil-drilling 'muds'	Xanthan
Suspending agent	Foods	Various
	Paper coatings	Xanthan
	Agrochemical pesticides and sprays	Xanthan
Viscosity control	Jel printing	

ที่มา: Sutherland (1998)

วัตถุประสงค์

1. เทียบเคียงชนิดของเชื้อราทนร้อนสายพันธุ์ ST29 ที่ผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพได้
2. ศึกษาคุณสมบัติบางประการและฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิเมอร์จากเชื้อรา

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. น้ำทิ้ง

ตัวอย่างน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (decanter effluent) จากบริษัทตรังน้ำมันปาล์ม จังหวัดตรัง

2. จุลินทรีย์

เชื้อราทนร้อนสายพันธุ์ ST29 จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เชื้อรา *Cordyceps dipterigena* BCC2073 และ *Cordyceps nipponicaa* BCC2092 จากห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato dextrose broth (PDB) ประกอบด้วย มันฝรั่ง 20 % และ น้ำตาลเด็กซ์โตส 2% สำหรับการเตรียม Potato dextrose agar (PDA) ให้เติมผงวุ้น 1.5%

Sabouraud dextrose agar (SDA) ประกอบด้วย นีโอเปปโตน 1 %, น้ำตาลเด็กซ์โตส 4 % และ ผงวุ้น 1.5%

อาหารสังเคราะห์จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (POME synthetic medium) ประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 1.23 %, เซลลูโลส 0.47 %, ไซแลน 0.52 %, แป้ง 0.48 %, น้ำตาลอะราบิโนส 0.30 %, ไซโลส 0.02 %, กลูโคส 0.01 %, กาแลคโตส 0.007 %, เคซีน 0.52 %, K_2HPO_4 0.10 %, KH_2PO_4 0.10 %, $MgSO_4.7H_2O$ 0.03 %, $MnSO_4.6H_2O$ 0.002 %, $FeSO_4.7H_2O$ 0.002 % และ NaCl 0.002 % (Somrutai *et al.*, 1996)

4. สารเคมี

ตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ เอทานอล, เมทานอล, อะซิโตน, เฮกเซน, คลอโรฟอร์มและไดคลอโรมีเทนเป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

อุปกรณ์

- เครื่อง gel permeation chromatography (GPC) รุ่น PL-GPC บริษัท Tosoh
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (refrigerated centrifuge) รุ่น Universal 32/32R บริษัท Universal 32R
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น U-2000 บริษัท Hitachi
- เครื่อง freeze dry รุ่น Flexi Dry บริษัท FTS system
- ตู้อบ (hot air oven) รุ่น UML.500 บริษัท Sanyo
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave) รุ่น SS325 บริษัท Tomy
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE 500 บริษัท Schwabach
- เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น M.3525-1 บริษัท Lab Line Instrument
- กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHS บริษัท Olympus Optical Co., Ltd.
- เครื่องให้ความร้อน (hot plate) รุ่น HS 115 บริษัท Ika Labotechnic
- เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น RO 5 บริษัท Ika Labotechnic
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) รุ่น 527044 บริษัท Hotpack
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP210-s บริษัท Sartorius
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น HF-1200 บริษัท A&D Company, Ltd
- เครื่องผสม (Vortex mixer) รุ่น 1297 บริษัท LAB-Line Instruments, Inc

วิธีการวิเคราะห์

1. การนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา

เจือจางสปอร์ตัวอย่างเชื้อราเริ่มต้นด้วยน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 เข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร หยดตัวอย่างลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ แล้วนับจำนวนสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์ ปรับความเข้มข้นของสปอร์ด้วยน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 เข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ได้ 2.4×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Karim and Kamil, 1989 อ้างโดยหัสลินดา บินมะแอ, 2548)

2. วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

กรองตัวอย่างน้ำหมักและเส้นใยปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผ่านผ้าขาวบางซึ่งทราบน้ำหนักแน่นอน ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเส้นใยบนผ้าขาวบางวางบนจานแก้วเลี้ยงเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอน อบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้จนเย็นที่อุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (AOAC, 1990)

วิธีการทดลอง

1. การเทียบเคียงชนิดของเชื้อราทนร้อน

1.1 การเทียบเคียงเชื้อโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เลี้ยงเชื้อราทนร้อนสายพันธุ์ ST29 ในอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน บันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อราและลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเทียบเคียงชนิดของเชื้อราในเบื้องต้น (Sutton *et al.*, 1998)

1.2 การเทียบเคียงเชื้อด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

การศึกษาทางชีวโมเลกุลเพื่อเทียบเคียงเชื้อราในระดับชนิดโดยส่งตัวอย่างทดสอบที่ห้องปฏิบัติการ Phylogenetics ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ซึ่งจะศึกษาในส่วน internal transcribed spacer (ITS) โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน ITS และ 5.8S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS5 นำผลิตภัณฑ์ PCR โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิ denaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที, extention ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที และตั้งให้ทั้ง 3 ปฏิกิริยาทำงาน 25 รอบ แล้วนำไปหาลำดับเบสโดยใช้เครื่อง DNA sequencer เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้ลำดับเบสของ partial DNA แล้วนำ partial DNA นั้นไปหา full length sequence และนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสจากฐานข้อมูลใน GenBank จาก Naional Center for Biotechnology Information server (NCBI: http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม basiclocal alignment search tools (BLAST)

2. การผลิตพอลิเมอร์จากเชื้อราและการทำบริสุทธิ์บางส่วน

2.1 *Rhizopus* sp. ST29

เลี้ยงเชื้อราทนร้อนใน POME synthetic medium โดยเติมสปอร์ของเชื้อราเริ่มต้น 2.4×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ วางฟลาสก์บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ชุดควบคุมคือชุดที่ไม่มีการเติมเชื้อ (หัสลินคา บินมะแอ, 2548)

2.2 *Cordyceps dipterigena* BCC2073 และ *Cordyceps nipponica* BCC2092

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และเจาะเส้นใยของเชื้อราในชิ้นวุ้น (ขนาด 1 ลบ.ซม.) ใส่ในอาหาร PDB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ

25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน กรองตัวอย่างน้ำหมักผ่านผ้าขาวบางที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นเติมเชื้อปริมาณ 5% ลงในอาหาร PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน สุ่มตัวอย่างทุกๆ 3 วันเพื่อวัดพีเอช วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเมอร์

วิเคราะห์ปริมาณพอลิเมอร์โดยนำน้ำหมักมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 *x g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 1) ตกตะกอนพอลิเมอร์จากสารละลายส่วนใสในเอทานอลปริมาตร 4 เท่าของสารละลายที่ได้ ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 *x g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำไดอะไลซีส (dialysis) (molecular weight cut off 8,000 Da) ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายพอลิเมอร์ที่ได้ไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) และชั่งน้ำหนัก (Madla *et al.*, 2004)

3. ศึกษาคุณลักษณะบางประการของพอลิเมอร์

นำพอลิเมอร์ที่ผลิตจากเชื้อรา *Rhizopus* sp. ST29, *Cordyceps dipterigena* BCC2073 และ *Cordyceps nipponica* BCC2092 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมาศึกษาคุณลักษณะบางประการ ดังนี้

3.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วย Gel Permeation Chromatography

เตรียมสารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้น 0.2 % กรองสารละลายพอลิเมอร์โดยใช้กระดาษกรองที่ทำด้วยไนล่อน ขนาด 0.45 ไมครอน ฉีดสารละลายพอลิเมอร์ที่ผ่านการกรองแล้วเข้าเครื่อง GPC คอลัมน์ที่ใช้คือ Ultrahydrogel linear 1 column สภาวะของเครื่องที่ใช้ในการทดลอง คือ อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสาร (flow rate) 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ 0.1 M sodium nitrate เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ โดยใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ Detector ที่ใช้คือ Refractive Index Detector โดยเครื่องสามารถวัดน้ำหนักโมเลกุลได้ในช่วง 1,000-20,000,000 ดาลตันและใช้พูลลูแลน (น้ำหนักโมเลกุล 5,900-1,660,000 ดาลตัน) เป็นพอลิเมอร์มาตรฐาน

3.2 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์

วิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์โดยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) โดยใช้เทคนิค Pellet (KBr) สภาวะการทดสอบคือ ช่วงคลื่น 4000 - 400 cm^{-1} โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์

นำพอลิเมอร์ปริมาณ 20 มิลลิกรัม ทำการไฮโดรไลซีส ด้วย 2 M Trifluoroacetic

acid ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง (Blakeney *et al.*, 1983) แล้วนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำตาล ดังนี้

3.1.1 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

นำสารละลายพอลิเมอร์ที่ผ่านการไฮโดรไลซีส มาหยดบนแผ่น TLC ชนิด normal phase ปริมาณ 0.05 ไมโครลิตร โดยเทียบกับน้ำตาลมาตรฐานได้แก่ ไซโลส อะราบิโนส ฟรุคโตสและกลูโคสในปริมาตรที่เท่ากัน นำแผ่น TLC แช่ใน TLC chamber ซึ่งมีระบบของตัวทำละลายเป็นอัตราส่วนของเอทิลอะซิเตต:ไอโซโพรพานอล:น้ำ เป็น 3:3:1 ตามลำดับ รอจนตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงขีดที่กำหนดไว้นำมาเป่าให้แห้ง หลังจากนั้นพ่นด้วยสารผสมระหว่างกรดซัลฟิวริก:เมทานอล อัตราส่วน 1:3 วางไว้จนแห้งและนำมาตรวจสอบการเกิดสีด้วยความร้อน โดยนำมาวางบน hot plate จนเห็นจุดสีน้ำตาลบนแผ่น TLC วัดระยะที่น้ำตาลและตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้แล้วนำมาคำนวณหาค่า R_f เพื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบ (ดัดแปลงจาก Kim and Yun, 2005)

3.1.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำสารละลายพอลิเมอร์ที่ผ่านการไฮโดรไลซีสมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำตาลโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ Zorbax Carbohydrate column (4.6 mm ID x 150 mm) ทำการชะด้วยส่วนผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำในอัตราส่วน 75 : 25 ด้วยอัตราเร็ว 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่แยกออกมาได้โดยการเปรียบเทียบค่า Retention time (RT) กับน้ำตาลมาตรฐาน (ไซโลส อะราบิโนส ฟรุคโตสและกลูโคส) หลังจาก HPLC แยกสารออกมาเป็นพีก (peak) ต่าง ๆ สามารถวัดปริมาณของสารในแต่ละพีกได้โดยวัดความสูงของพีก (peak height) เทียบกับความสูงของพีกของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณ และวัดพื้นที่พีก (peak area) เทียบกับพื้นที่ของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่ฉีดเข้าไป

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

เติมสารละลายพอลิเมอร์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตรในหลอดทดสอบแล้ว เติมสาร alkali copper (เตรียมจากสารละลาย Na2CO3 2% ใน NaOH 0.1 N 50 มิลลิลิตรกับสารละลาย CuSO4.5H2O 0.5% ใน sodium potassium tartrate 1%) (ควรเตรียมในวันที่ใช้) 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย Folin-ciocateus reagent 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm

3.5 คุณสมบัติการละลายของพอลิเมอร์

ทดสอบความสามารถในการละลายของพอลิเมอร์ในตัวทำละลายหลายชนิด โดยชั่งพอลิเมอร์ 1 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตร สังเกตการละลายของพอลิเมอร์หลังจากตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน โดยเปรียบเทียบกับตัวทำละลายที่ไม่มีการเติมพอลิเมอร์ ตัวทำละลายที่ใช้ทดสอบมีดังนี้ น้ำกลั่น เมทานอล เอทานอล อะซิโตน คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน เฮกเซน (Collins *et al.*, 1973)

3.6 คุณสมบัติการเกิดเจลของพอลิเมอร์

3.6.1 ทดสอบการเกิดเจลของพอลิเมอร์

ทดสอบความสามารถในการเกิดเจลของพอลิเมอร์ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง โดยเติม $CaCl_2.2H_2O$ ปริมาณ 2 มิลลิกรัม และสารละลายของพอลิเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.5 % (น้ำหนักต่อ ปริมาตร) ปรับพีเอชให้มีค่า 10 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ผสมให้เข้ากันวิเคราะห์ผลโดยวัดค่าความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield Viscometer (Anita and Avinash, 1995)

3.6.2 ผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ต่อการเกิดเจล

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 แต่แปรผันความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่คัดเลือกได้เป็น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% วิเคราะห์ผลโดยวัดค่าความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield Viscometer เปรียบเทียบผลการทดลองเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของพอลิเมอร์ต่อการเกิดเจล

3.6.3 ผลของพีเอชต่อการเกิดเจล

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1 โดยปรับพีเอชของสารละลายพอลิเมอร์ที่คัดเลือกเป็น 8, 10 และ 12 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ วิเคราะห์ผลโดยวัดค่าความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield Viscometer

4. คุณสมบัติของฟิล์มจากพอลิเมอร์ของเชื้อรา

4.1 การทำแผ่นฟิล์มจากพอลิเมอร์ของเชื้อรา

เตรียมสารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 % (v/w) เติมกลีเซอรอล 50 % ของปริมาณพอลิเมอร์ รินสารละลายผสม 10 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร) อบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10-12 ชั่วโมง วัดความหนาของฟิล์มด้วยไมโครมิเตอร์ที่อ่านละเอียด 0.01 มิลลิเมตร ทำการวัดหลายๆตำแหน่งตามแนวความยาวของแผ่นฟิล์ม

4.2 คุณสมบัติของแผ่นฟิล์ม

4.2.1 ค่าการต้านทานแรงดึง (tensile strength) และค่าการยืดตัวเมื่อขาด (% elongation at brake)

- ทำการวัดค่าการต้านทานแรงดึง และค่าการยืดตัวเมื่อขาด ตามวิธีการของ ASTM (1996) โดยใช้เครื่องทดสอบความแข็งแรงของวัสดุ (universal testing machine LLYOD รุ่น 30 KN) กำหนดระยะห่างของการจับเริ่มต้น (initial grip separation) เท่ากับ 40 มิลลิเมตร และความเร็วของการทดสอบ (test speed) เท่ากับ 50 มิลลิเมตรต่อนาที บันทึกแรงดึงสูงสุดและส่วนยืดสูงสุดเมื่อฟิล์มขาดโดย

การต้านทานแรงดึง เป็นการวัดความสามารถของวัสดุที่ต้านทานต่อการขาดภายใต้แรงดึง คำนวณได้จาก

$$\text{การต้านทานแรงดึง } (N/mm^2) = \frac{\text{แรงดึงสูงสุด}}{\text{พื้นที่หน้าตัดของชิ้นงาน}}$$

ค่าการยืดตัวเมื่อขาด (% elongation at break) คือการยืดออกของชิ้นทดสอบที่แสดงเป็นเปอร์เซนต์ของความยาวเริ่มต้น ซึ่งการยืดตัวนี้เกิดขึ้นภายใต้แรงดึงก่อนชิ้นงานจะขาด

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาด} = \frac{\text{ความยาวที่เพิ่มขึ้น}}{\text{ความยาวเดิม}} \times 100$$

4.3 การทดสอบการปลดปล่อยยาจากแผ่นฟิล์ม

4.3.1 การเตรียมฟิล์มที่ผสมยา

เตรียมสารละลายพอลิเมอร์สำหรับขึ้นรูปฟิล์มตามวิธีการข้อ 4.1 จากนั้นเติมยาคลินดามัยซิน (Clindamycin) ลงในสารละลายพอลิเมอร์ โดยมีความเข้มข้นของตัวยา 1 % (ขนาดปกติที่ใช้ในการรักษา) ของน้ำหนักพอลิเมอร์ รินสารละลายผสม 10 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร อบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10-12 ชั่วโมง จะได้ฟิล์มหนาประมาณ 0.1-0.3 มิลลิเมตร

4.3.2 การศึกษาการปลดปล่อยยาแบบภายนอกร่างกายจากแผ่นฟิล์ม

ศึกษาการปลดปล่อยยาจากแผ่นฟิล์มโดยใช้เครื่องทดสอบการละลาย (dissolution apparatus) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ phosphate buffer pH 7.4 0.2 M เป็น dissolution medium ทำการสุ่มตัวอย่างทุก 15 นาที ในชั่วโมงแรก และต่อมาสุ่มตัวอย่างทุก 30 นาที จนครบ 6 ชั่วโมง แทนที่สารละลายที่สุ่มตัวอย่างด้วย phosphate buffer พีเอช 7.4 ทุกครั้งหลังทำการสุ่มตัวอย่าง นำสารละลายที่สุ่มตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV spectrophotometry ที่ความ

ยาวคลื่น 262 นาโนเมตร คำนวณปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยที่เวลาต่างๆ (ดัดแปลงจาก Arnarddttir *et al.*, 1996)

5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิเมอร์จากเชื้อรา

นำพอลิเมอร์มาละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra และ *Staphylococcus aureus*) กิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา (*Candida albican* ATCC 90028) และกิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (KB- Oral human epidermal carcinoma, NCI-H187- Small cell lung cancer และ BC-Breast cancer) โดยส่งตัวอย่างทดสอบที่ห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ยกเว้นการทดสอบ *Staphylococcus aureus*)

5.1 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

5.1.1 ทดสอบการยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

ทดสอบโดยใช้วิธี Microplate Alamar Blue Assay (MABA) (Collins and Franzblau, 1997) ในจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Middlebrook 7H9 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในช่วง 0.4-0.5 ที่ความยาวคลื่น 450 nm และทำการเจือจางด้วยอาหาร Middlebrook 7Hg อีก 100 เท่าเพื่อนำไปทดสอบกับสารละลายพอลิเมอร์ เติมสารละลาย Alamar Blue ในอัตราส่วน 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

เติมสารละลายพอลิเมอร์ที่ต้องการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* ลงในจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุมให้มีความเข้มข้น 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเชื้อทดสอบมาเติมสารละลาย Alamar Blue ในอัตราส่วน 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติมลงไปในจานเพาะเชื้อแต่ละหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 10-15 ชั่วโมง สังเกตการณ์เปลี่ยนสีของ Alamar Blue ที่ปกติจะมีสีน้ำเงินเข้ม หากหลุมใด Alamar Blue ไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าหลุมนั้นไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย แสดงว่าสารละลายพอลิเมอร์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ แต่ถ้าหลุมใดมีการเปลี่ยนสีของ Alamar Blue แสดงว่าหลุมนั้นมีการเจริญของจุลินทรีย์ แสดงว่าสารละลายพอลิเมอร์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ใช้ยามาตรฐาน Rifampicin Kanamycin และ Isoniazid เป็น positive control และ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เป็น negative control รายงานผลเป็นค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายพอลิเมอร์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยแปลผลการทดสอบตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การแปลผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย

Table 7 Interpretation of antibacterial testing

% inhibition	Activity
< 90 %	Inactive
≥ 90 %	Active (MIC included)

5.1.2 ทดสอบการยับยั้ง *Staphylococcus aureus*

ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ของพอลิเมอร์โดยวิธี agar diffusion method เตรียมสารละลายชีวภาพเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ยามาตรฐาน Penicillin G เป็น positive control และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็น negative control ใช้ loop เขี่ยเชื้อทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Broth (MHB) 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-8 ชั่วโมง นำมาเปรียบเทียบความขุ่นกับ 0.5% McFarland standards ซึ่งเทียบเท่ากับมีจำนวนเชื้อ 10^8 cell/ml (ถ้าขุ่นเกินไปให้เจือจางด้วยสารละลาย 0.85% NaCl) ใช้ sterile cotton swab จุ่มลงในอาหาร MHB ที่มีเชื้อทดสอบอยู่บิดให้หมาดๆ แล้วป้ายลงให้ทั่วจุ่นอาหาร MHB ทิ้งไว้ 3-5 นาที ดูดตัวอย่างยาและสารละลายชีวภาพ 10 ไมโครลิตร หยดลงบน antibiotic disc แล้วใช้ปากคีบคีบแผ่น antibiotic disc แล้ววางบน agar plate กดให้แน่น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัด inhibition zone (Borel *et al.*, 1993)

5.2 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา (Antifungal activity)

ทดสอบการยับยั้ง *Candida albican* (ATCC 90028) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ใช้ loop เขี่ยเชื้อมา 5 โคโลนีใส่ในอาหารเหลว RPMI1640 บ่มบนเครื่องเขย่า และเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI1640 ให้ได้จำนวนเซลล์ 2×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร เติมสารละลายพอลิเมอร์ที่ต้องการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *Candida albican* ลงในจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติมเชื้อทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายผสม MTT (ผสม XTT ในอาหารเหลว RPMI1640 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับ PMS 1.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน PBS ในอัตราส่วน 1:6) 50 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ใช้ยามาตรฐาน Amphotericin B เป็น positive control และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็น negative controlและ

รายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 % (IC_{50}) โดยแปลผลการทดสอบตามตารางที่ 8 (Plumb *et al.*, 1989)

ตารางที่ 8 การแปลผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา

Table 8 Interpretation of antifungal testing

IC_{50} (ug/ml)	Activity
> 50	Inactive
> 20 - 50	Weakly active
5 - 20	Moderately active
< 5	Strongly ative

5.3 กิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Anticancer activity)

ทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB (Oral human epidermoid carcinoma), NCI-H187 (Small cell lung cancer) และ (BC) Breast cancer โดยวิธี colorimetric cytotoxicity assay (Skehan *et al.* 1990) นำเซลล์มะเร็ง KB MCF7 และ NCI-H187 ที่เตรียมให้อยู่ในระยะ log phase ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาผสมกับพอลิมอร์ (พอลิเมอร์ 10 ไมโครกรัมใน 10% DMSO) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เขย่าให้เข้ากันและเติมลงในจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุมให้มีปริมาตรรวมเป็น 200 ไมโครลิตร ใช้ยามาตรฐาน Ellipticin และ Doxorubicin เป็น positive control และ DMSO เป็น negative control นำไปเลี้ยงในตู้บ่ม CO_2 ซึ่งมีความหนาแน่นของ CO_2 ในอากาศ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นตรึงเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ในแต่ละหลุมด้วยการเติม ด้วย trichloroacetic acid 50% บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ย้อมสีด้วย sulforhodamine B 0.05 % (เตรียมใน 1% acetic acid) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำมาล้างด้วย 1 % acetic acid ตั้งทิ้งไว้ให้ plate แห้ง จากนั้นเติม 10 mM tris base ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร และเขย่าเป็นเวลา 5 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 510 nm และรายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 % (IC_{50}) โดยแปลผลการทดสอบตามตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การแปลผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

Table 9 Interpretation of anticancer testing

IC_{50} (ug/ml)	Activity
> 20	Inactive
> 10- 20	Weakly active
5 - 10	Moderately active
< 5	Strongly ative

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การทียบเคียงชนิดของเชื้อราทนร้อน

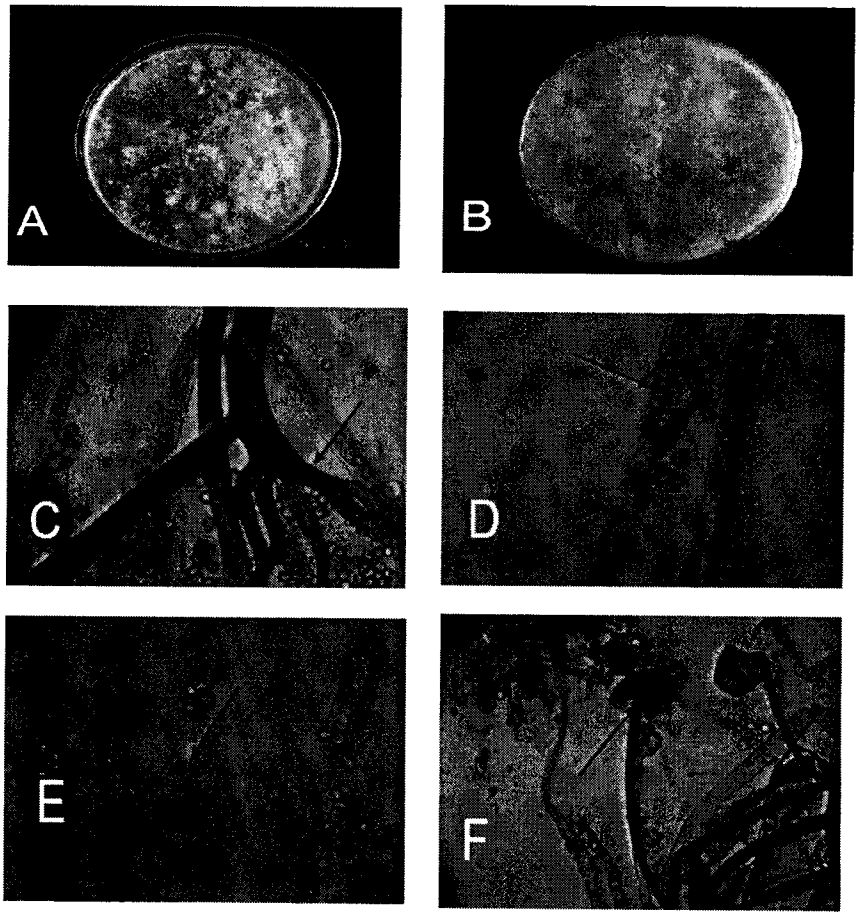
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวโมเลกุล

เลี้ยงเชื้อราทนร้อนสายพันธุ์ ST29 ในอาหาร SDA บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่าโคโลนีของเชื้อรามีการเจริญอย่างรวดเร็ว โดยเส้นใยจะเต็มจานเลี้ยงเชื้อในเวลา 2-3 วัน ลักษณะของไมซีเลียมคล้ายสำลีฟูๆ ระยะแรกมีสีขาวต่อมามีสีเทาดำ และจากการศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 4) พบ hypha ไม่มี septum มี stolon ซึ่งเป็น hypha ที่เชื่อมอยู่ระหว่าง sporangiophore ส่วนปลายสุดของ sporangiophore โป่งออกลักษณะคล้าย cone คว่ำ เรียกว่า columella ซึ่งจะเป็นส่วนที่อยู่ในเยื่อหุ้มรูปทรงกลมคว่ำเรียกว่า sporangium ภายใน sporangium บรรจุสปอร์จำนวนมากมีลักษณะทรงกลมสีน้ำตาลดำ และมีลักษณะเด่นคือมี rhizoid (hypha ลักษณะคล้ายรากต้นไม้) ตรงบริเวณเดียวกับที่มี sporangiophore สามารถเทียบเคียงชนิดของเชื้อราได้เป็น *Rhizopus* sp. (Diaz-Guerra *et al.*, 2000)

การศึกษาทางชีวโมเลกุลเพื่อเทียบเคียงเชื้อราในระดับสปีชีส์โดยศึกษาในส่วน internal transcribed spacer (ITS) ของยีนในนิวเคลียสซึ่งทำหน้าที่กำหนดการสร้าง ribosomal RNA (nuclear-encoded ribosomal RNA gene : rDNA) เป็นยีนที่มีอยู่หลายชุดในกลุ่มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตของ eukaryote ซึ่งในแต่ละชุดประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาดเล็กของยีน 18S rRNA gene, ITS region, ยีนของ 5.8S rRNA และหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของ 25-28S RNA, intergenic spacer (IGS) regions และยีน 5S rRNA บน rDNA ในส่วน ITS1 และ ITS2 region ซึ่งเป็นส่วนที่มีความผันแปรในลำดับเบสมาก ได้มีการนำมาใช้ในการเทียบเคียงสิ่งมีชีวิตในระดับสปีชีส์ของเชื้อรา หรือแม้กระทั่งระดับต่ำกว่าสปีชีส์ (Destefano, 2004)

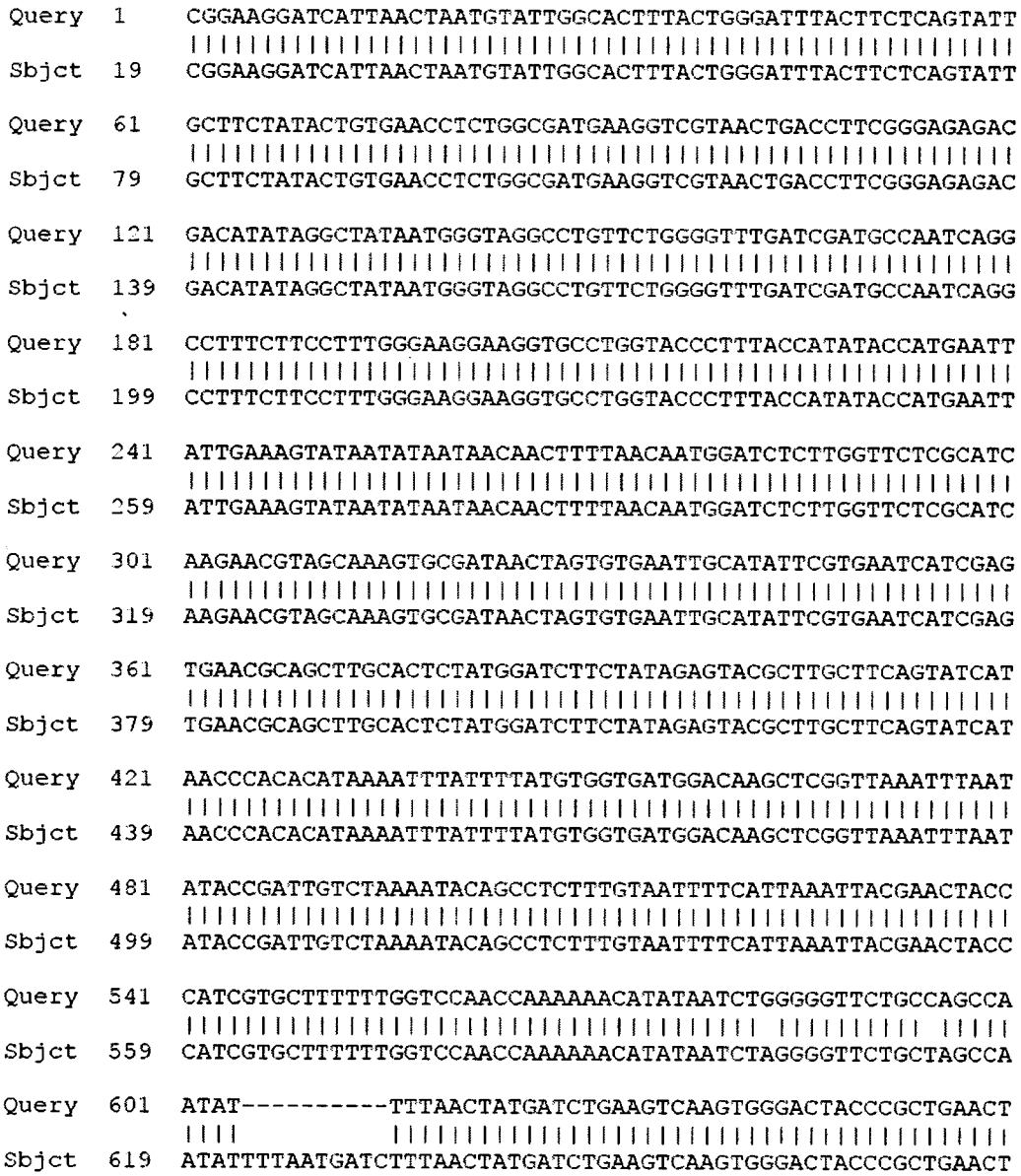
จากการศึกษาทางชีวโมเลกุลของเชื้อรา *Rhizopus* sp. ST29 ในตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน ITS และ 5.8S rDNA ด้วยเทคนิค PCR และใช้ข้อมูลของลำดับเบสในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank จาก Naional Center for Biotechnology Information Server (NCBI: http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม basic local alignment search tools (BLAST) ผลจากลำดับเบสสามารถเทียบเคียงชนิดของเชื้อราได้เป็น *Rhizopus oryzae* (ค่าความเหมือน 98%, 652/664) (ภาพที่5) ซึ่งสอดคล้องกับผลการจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีรายงานว่าเชื้อรา

หลายชนิดได้มีการนำเอาเทคนิคการอ่านลำดับเบสมาวินิจฉัยร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งพบว่าให้ผลตรงกันหรือสอดคล้องกัน (Valadares *et al.*, 1997 อ้างโดย เบญจมาศ ทรงพระ, 2547)



ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากเชื้อราทนร้อนสายพันธุ์ ST29: (A) ด้านหน้าโคโลนี (B) ด้านหลังโคโลนี: (C) brownish rhizoids, (D) broad hyphae และ lemon-shape sporangiospores with striate surfaces, (E) chlamydospores, (F) sporangiophores with columella

Figure 4 Colony and morphology under microscope from isolate ST29 : (A) infront of colony (B) back of colony: (C) brownish rhizoids, (D) broad hyphae and lemon-shape sporangiospores with striate surfaces, (E) chlamydospores, (F) sporangiophores with columella



ภาพที่ 5 ลำดับเบสของเชื้อราทนร้อนสายพันธุ์ ST29 ซึ่งมีความเหมือนกับ *Rhizopus oryzae* 98 %

Figure 5 The sequence of the isolate ST29 showed homology with *Rhizopus oryzae* with 98% identity

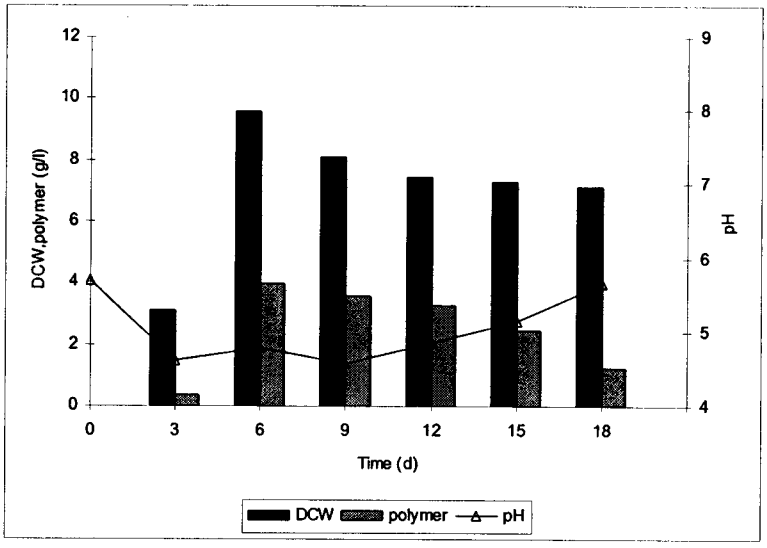
2. การผลิตพอลิเมอร์จากเชื้อราและการทำบริสุทธิ์บางส่วน

2.1 การผลิตพอลิเมอร์

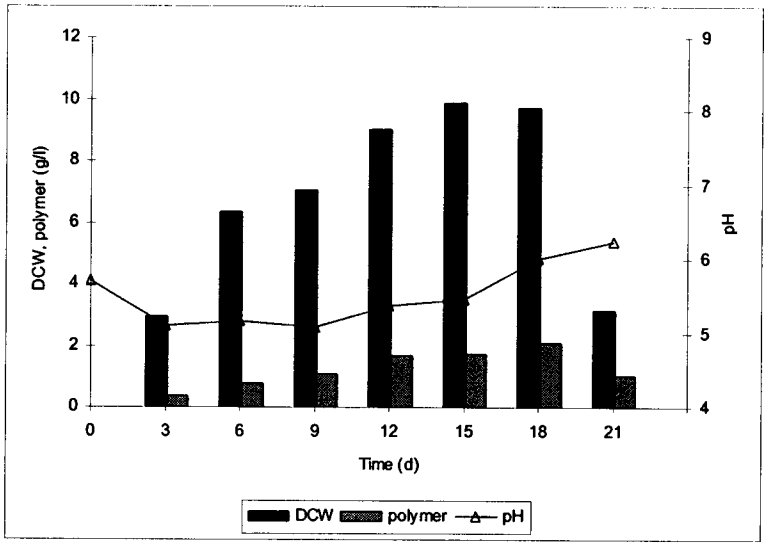
จากการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ST29 ในน้ำทิ้งสังเคราะห์บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่า *Rhizopus oryzae* ST29 สามารถเจริญและให้ผลผลิตของพอลิเมอร์เท่ากับ 3.09 $\pm$ 0.13 กรัมต่อลิตร และ 5.64 $\pm$ 0.57 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยน้ำหมักที่ได้มีลักษณะใสและไม่มีความหนืด

การเจริญและการผลิตพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Cordyceps dipterigena* BCC2073 และ *Cordyceps nipponica* BCC2092 ในอาหาร PDB พบว่า *Cordyceps dipterigena* สามารถเจริญ (9.57 กรัมต่อลิตร) และผลิตพอลิเมอร์ (3.94 กรัมต่อลิตร) ได้สูงสุดหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 วัน ขณะที่ *Cordyceps nipponica* สามารถเจริญ (9.88 กรัมต่อลิตร) และผลิตพอลิเมอร์ได้สูงสุด (2.07 กรัมต่อลิตร) หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 15 วันและ 18 วัน ตามลำดับ (ภาพที่ 6) คิดเป็นค่าอัตราการเจริญเท่ากับ 1.6 และ 0.7 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ และอัตราการผลิตพอลิเมอร์เท่ากับ 0.7 และ 0.1 กรัมต่อลิตรต่อวันตามลำดับ สำหรับการเปลี่ยนแปลงพีเอชของ *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* เป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือพีเอชจะลดลงในการเลี้ยงระยะแรกและจะค่อยๆเพิ่มขึ้นจนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการเลี้ยง ระหว่างการเลี้ยงเชื้อพบว่าลักษณะของน้ำหมักมีความหนืด โดยน้ำหมักของเชื้อ *Cordyceps dipterigena* มีลักษณะใสข้นหนืด ส่วนน้ำหมักจาก *Cordyceps nipponica* มีลักษณะขาวขุ่นและข้นหนืด ซึ่งความหนืดจะเพิ่มขึ้นเมื่อจุลินทรีย์หลั่งสารพอลิเมอร์ออกมาละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* ซึ่งความหนืดของน้ำหมักเพิ่มขึ้นพร้อมๆ กับปริมาณของพอลิเมอร์ที่เพิ่มขึ้น โดยให้ค่าความหนืดสูงสุด 17 cP ที่ชั่วโมงที่ 96 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่เชื้อผลิตพอลิเมอร์ได้สูงสุด (14 กรัมต่อลิตร) (Shin *et al.*, 2001 อ้างโดยรพีพรรณ เติมตันท์, 2547) เมื่อทำการเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์ของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์พบว่า ลักษณะของพอลิเมอร์หลังการตกตะกอนด้วยเอทานอลมีลักษณะเป็นเส้นใยรวมกลุ่มกัน (ภาพที่ 7) ทำให้สามารถเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์ได้ง่ายโดยการกรอง หรือหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบต่ำ (1000 รอบต่อนาที) ลักษณะปรากฏของพอลิเมอร์จากเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์หลังการทำบริสุทธิ์บางส่วนมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ สีขาวขุ่น (ภาพที่ 8) เช่นเดียวกับลักษณะของพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อ *Enterobacter cloacae* WD7 (Dermlim, 1999)

(a)

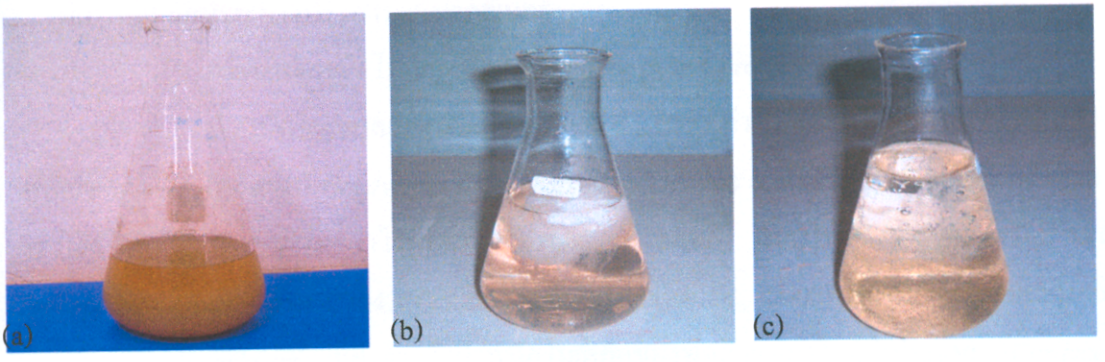


(b)



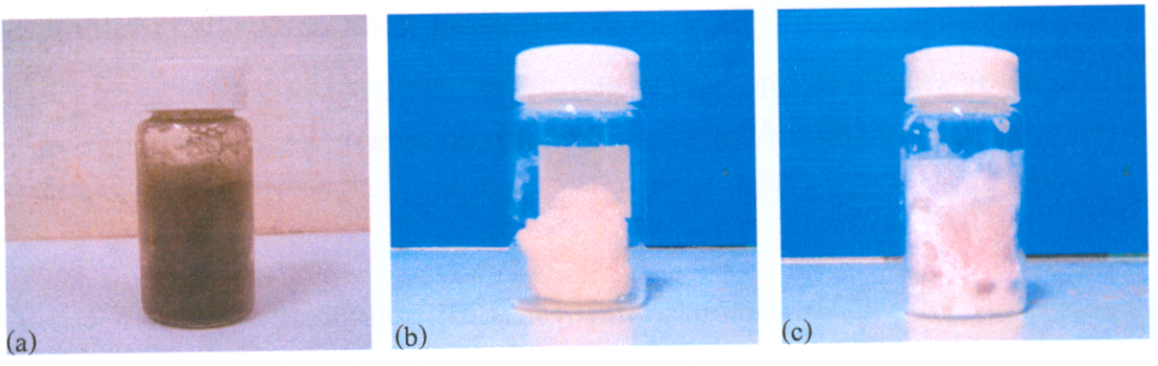
ภาพที่ 6 ค่าการเจริญ การผลิตพอลิเมอร์ และค่าพีเอชของเชื้อรา (a) *Cordyceps dipterigena* (b) *Cordyceps nipponica* เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDB บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Figure6 Time course of polymer produced by (a) *Cordyceps dipterigena* (b) *Cordyceps nipponica* cultivated in PDB on a rotary shaker (200 rpm) at 25 ^{0}C



ภาพที่ 7 ลักษณะของพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก (a) *Rhizopus oryzae* ST29 (b) *Cordyceps dipterigena* (c) *Cordyceps nipponica* หลังจากตกตะกอนด้วยเอทานอล

Figure 7 The fibrous characteristics of polymer from (a) *Rhizopus oryzae* ST29 (b) *Cordyceps dipterigena* (c) *Cordyceps nipponica* after precipitation with ethanol



ภาพที่ 8 ลักษณะปรากฏของพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก (a) *Rhizopus oryzae* ST29 (b) *Cordyceps dipterigena* (c) *Cordyceps nipponica* หลังจากผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

Figure 8 The apperence characteristics of polymer from (a) *Rhizopus oryzae* ST29 (b) *Cordyceps dipterigena* (c) *Cordyceps nipponica* after freeze drying

3. ศึกษาคุณลักษณะบางประการของพอลิเมอร์

3.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลด้วย Gel Permeation Chromatography (GPC)

น้ำหนักโมเลกุลของ *Rhizopus oryzae* ST29 มีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Cordyceps sphecocephala* (27 kDa) (Oh *et al.*, 2007) และมีค่าสูงกว่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์จาก *Torrubiella tenuis* BCC1056 (21.08 kDa) และ *Zygosporium masonii* BCC7543 (23.20 kDa) (Madla *et al.*, 2005) ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของ *Cordyceps dipterigena* มีค่าต่ำกว่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Cordyceps sinensis*16 (126 kDa) (Cha *et al.*, 2007) ขณะที่น้ำหนักโมเลกุลของ *Cordyceps nipponica* มีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Antrodia cinnamomea* (2876 kDa) (Chen *et al.*, 2005) และมีค่าต่ำกว่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์จาก *Phoma herbarum* CCFEE 5080 (7400 kDa) (Selbmann *et al.*, 2002) ซึ่งเกิดจากหน่วยหรืออนุพันธุ์ของโมโนเมอร์แซคคาไรด์เชื่อมต่อกันมากกว่า 10 หน่วยขึ้นไป ($n \geq 10$) (Mcilray, 1967 อ้างโดยระพีพรรณ เติมตันท์, 2547) ผลจากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วยวิธี GPC พบว่าพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 26.7, 18.4 และ 2,862 กิโลดาลตัน ตามลำดับ สำหรับค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลมีค่าเท่ากับ 1.81, 4.05 และ 2.69 ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์มีผลโดยตรงกับคุณสมบัติด้านความหนืด พอลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีความหนืดมากกว่าพอลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Rew *et al*,. 2000)

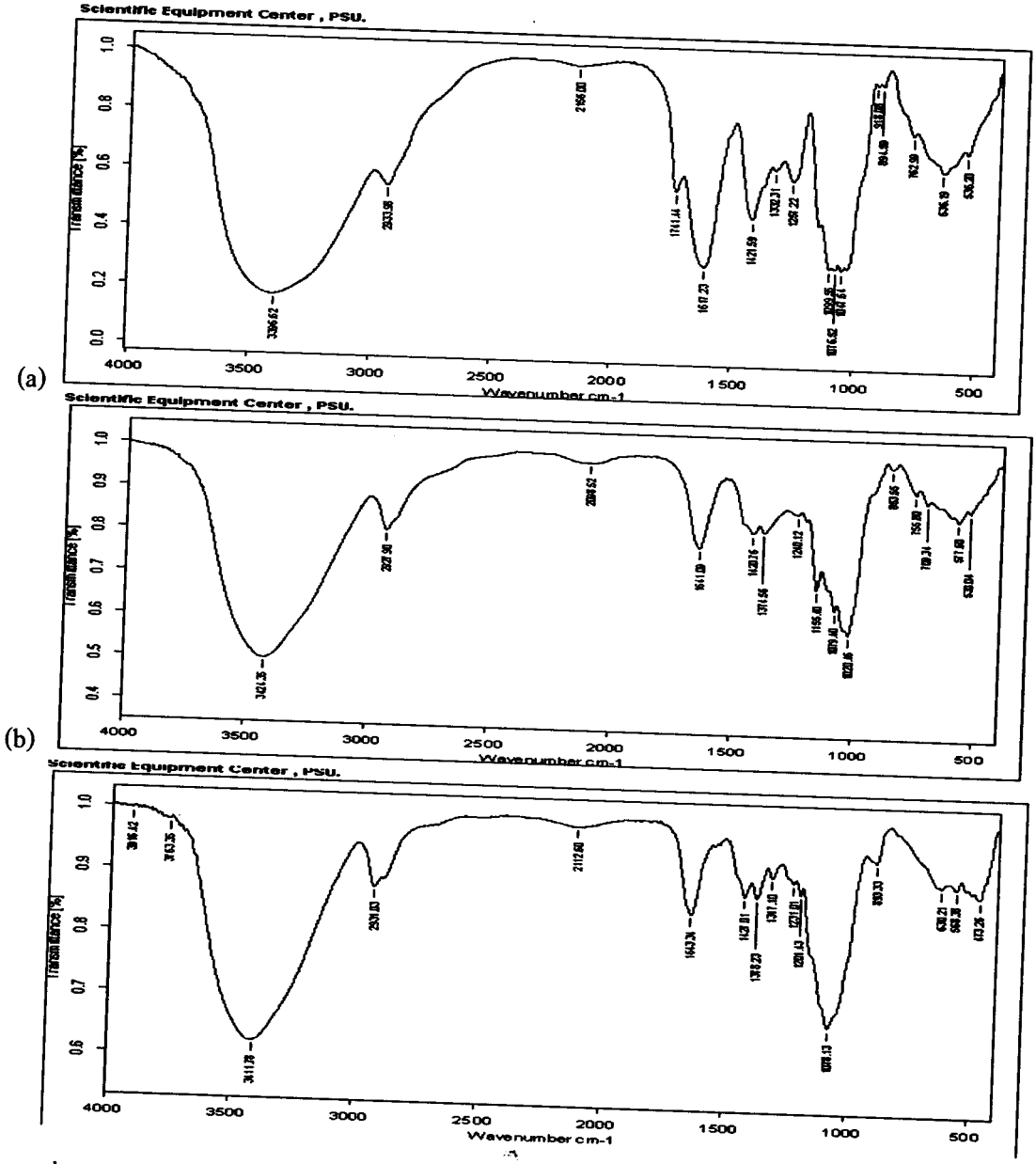
ตารางที่ 10 น้ำหนักโมเลกุล และการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ โดย Gel Permeation Chromatography (GPC)

Table 10 Molecular weight and polydispersity of polymers determined by Gel Permeation Chromatography (GPC)

พอลิเมอร์จากเชื้อรา	น้ำหนักโมเลกุล (Mw) (kDa)	การแจกแจงน้ำหนักโมเลกุล (Mw/Mn)
Rhizopus oryzae ST29	26.7	1.81
Cordyceps dipterigena	18.4	4.05
Cordyceps nipponica	2,862	2.69

3.2 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน

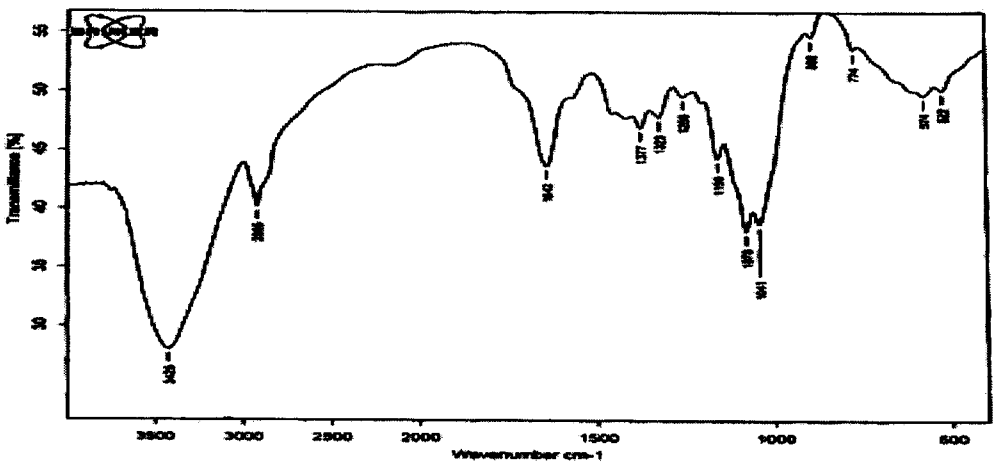
เมื่อวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* ด้วย FT-IR พบว่าแถบที่ปรากฏในย่านความถี่ 4000-400 cm^{-1} ของทั้ง 3 ตัวอย่าง มีลักษณะเหมือนกัน (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 อินฟาเรดสเปคตรัมของพอลิเมอร์จาก (a) *Rhizopus oryzae* ST29, (b) *Cordyceps dipterigena* (c) *Cordyceps nipponica*

Figure 9 The infrared spectrum of polymer from a) *Rhizopus oryzae* ST29, (b) *Cordyceps dipterigena* (c) *Cordyceps nipponica*

โดยพบแถบสเปคตรัมที่เกิดจากการยืดของพันธะ C_1-H (β-glycosicdic linkage) ในช่วงความถี่ 893-895 cm^{-1}(ตารางที่ 11) และแถบสเปคตรัมที่เป็นตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล (ช่วงความถี่ 3392-3424 cm^{-1}) คาร์บอนิล (ช่วงความถี่ 1617-1643 cm^{-1}) และอีเทอร์ (ช่วงความถี่ 1020-1155 cm^{-1}) นอกจากนั้นยังพบแถบที่เกิดจากการยืดตัว (ในช่วงความถี่ 2900-3000 cm^{-1}) และแถบที่เกิดจากการงอ (ในช่วงความถี่ 1400-1500 cm^{-1}) ของพันธะ C-H แถบสเปคตรัมและหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์จากเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ปรากฏนั้นมีลักษณะของการเกิดแถบที่คล้ายกันกับพอลิแซคคาไรด์ชนิดกลูแคนที่เคยมีรายงานมา เช่นจากการทดลองของ Huang และคณะ (2004) โดยแสดงแถบสเปคตรัมที่เกิดจากการยืดของพันธะ C_1-H (β-glycosicdic linkage), หมู่ไฮดรอกซิล, คาร์บอนิล และอีเทอร์เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 อินฟาเรดสเปคตรัมของกลูแคนจาก *Saccharomyces cerevisiae*

Figure 10 The infrared spectrum of glucan from *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา: Huang และคณะ (2004)

ตารางที่ 11 ลักษณะสเปคตรัมที่เกิดขึ้น และ wave number ของหมู่ฟังก์ชันที่ดูดกลืนแสงจากพอลิเมอร์เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR

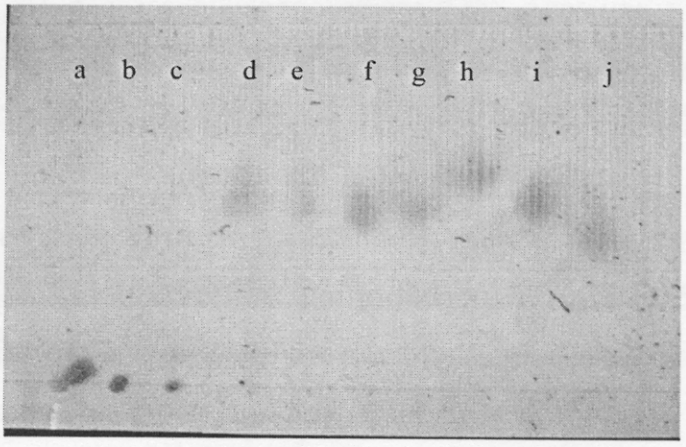
Table 11 The dominant spectrum and wave number of extracted partially purifyied polymer by FT-IR

Polymer	Wave number (cm^{-1})	Functional group	Refference
Rhizopus oryzae	3392.62	OH (hydroxyl)	Zhang *et al.*, 2006
ST29	2933.98	C-H stretching	Singh *et al.*, 2006
	1617.23	C=O	Zhang *et al.*, 2006
	1421.59	CH_2 deformations	Zhang *et al.*, 2006
	1076.52	C-O-C (ether)	Zhang *et al.*, 2006
	894.59	C_1-H (β-glycosicdic linkage)	Huang *et al.*, 2004
Cordyceps	3424.35	OH	Zhang *et al.*, 2006
dipterigena	2927.90	C-H stretching	Singh *et al.*, 2006
	1641.09	C=O	Zhang *et al.*, 2006
	1420.76	CH_2 deformations	Zhang *et al.*, 2006
	1155.40, 1020.46	C-O-C (ether)	Zhang *et al.*, 2006
	853.55	C_1-H (β-glycosicdic linkage)	Huang *et al.*, 2004
Cordyceps	3411.78	OH	Zhang *et al.*, 2006
nipponica	2931.03	C-H stretching	Singh *et al.*, 2006
	1643.34	C=O	Zhang *et al.*, 2006
	1427.01	CH_2 deformations	Zhang *et al.*, 2006
	1078.13	C-O-C (ether)	Zhang *et al.*, 2006
	893.33	C_1-H (β-glycosicdic linkage)	Huang *et al.*, 2004

3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์

เมื่อวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) โดยมีน้ำตาลไซโลส อะราบิโนส ฟรุคโตสและกลูโคสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน

พบว่าน้ำตาลมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดคือ ไซโลส อะราบิโนส ฟรุคโตสและกลูโคส มีค่า Retention factor (R_f) เท่ากับ 0.40, 0.59, 0.51 และ 0.50 ตามลำดับ ส่วนพอลิเมอร์ที่ผลิตจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* มีค่า R_f เท่ากับ 0.50, 0.50 ละ 0.49 ตามลำดับ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่า R_f ของน้ำตาลมาตรฐานพบว่าตรงกับน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียว สรุปได้ว่าพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ST29 *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว (ภาพที่ 11)



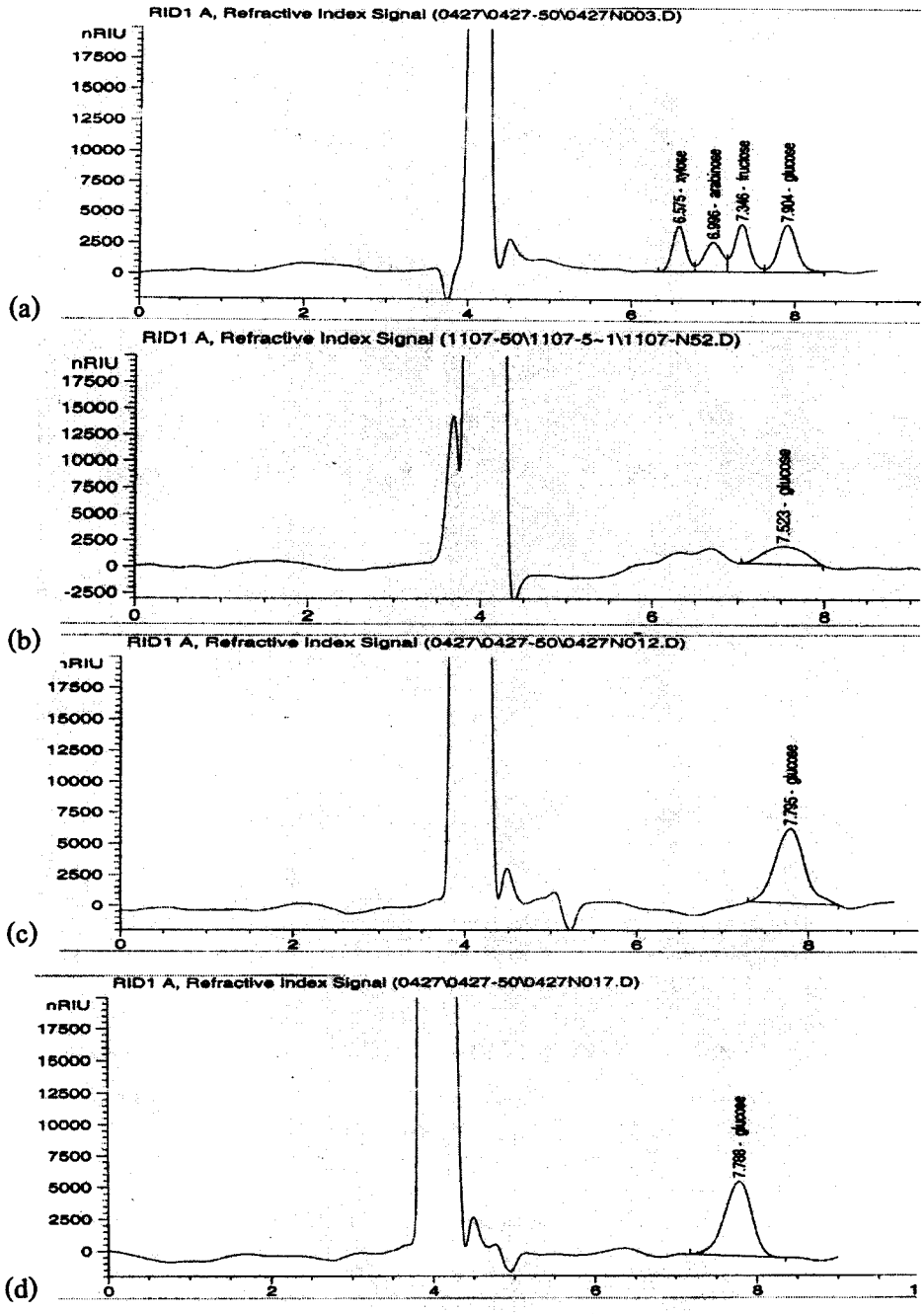
ภาพที่ 11 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ผลิตจากเชื้อรา (d) *Rhizopus oryzae* ST29 (e) *Cordyceps dipterigena* (f) *Cordyceps nipponica* และน้ำตาลมาตรฐาน : (g) กลูโค (h) อะราบิโนส (i) ฟรุคโตส (j) ไซโลส และพอลิเมอร์ที่ไม่ผ่านการย่อย (a) *Rhizopus oryzae* ST29 (b) *Cordyceps dipterigena* (c) *Cordyceps nipponica*

Figure 11 TLC identification of hydrolysis products obtain from polymer produced by (d) *Rhizopus oryzae* ST29 (e) *Cordyceps dipterigena* (f) *Cordyceps nipponica* and standard sugar (g) glucose (h) arabinose (i) fructose (j) xylose and polymer unhydrolyzed (a) *Rhizopus oryzae* ST29 (b) *Cordyceps dipterigena* (c) *Cordyceps nipponica*

การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์โดยวิธี HPLC โดยเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน คือ ไซโลส อะราบิโนส ฟรุคโตสและกลูโคส ใช้ Zorbax Carbohydrate column ทำการชะด้วยส่วนผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ อัตราส่วน 75 : 25 ด้วยอัตราเร็ว 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที พบว่าสารมาตรฐานน้ำตาลทั้ง 4 ชนิดคือ ไซโลส อะราบิโนส ฟรุคโตสและกลูโคส ถูกแยกออกมาที่เวลา 6.575, 6.996, 7.346 และ 7.904 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 13) ส่วนพอลิเมอร์จาก *Rhizopus oryzae* ST29 *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* ปรากฏออกมาเพียง 1 peak เท่านั้น (ภาพที่ 12) ซึ่งมีขนาดและความสูงใกล้เคียงกัน โดย peak ดังกล่าวจะถูกแยกออกมาที่เวลา 7.523, 7.795 และ 7.788 นาทีตามลำดับ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเวลาในการใช้แยกสารมาตรฐานน้ำตาลทั้ง 4 ชนิดพบว่าตรงกับน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียวและมีปริมาณ 118.34, 911.02 และ 951.95 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์ พบว่าพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ST29 มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 108 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ในขณะที่พอลิเมอร์จาก *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* มีโปรตีนในปริมาณเล็กน้อยคือ 1.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ตามลำดับ

จากการศึกษาองค์ประกอบขั้นต้นบนแผ่น TLC, HPLC และการหาปริมาณโปรตีน พบว่าพอลิเมอร์จาก *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวคือน้ำตาลกลูโคสจึงจัดเป็นกลูแคน สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งพบว่าพอลิแซคคาไรด์จาก *Cordyceps dipterigena*, *Cordyceps nipponica* (Madla *et al.*, 2005) และ *Cordyceps militaris* (Yu *et al.*, 2004) มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว อย่างไรก็ตามพอลิแซคคาไรด์จาก *Cordyceps sinensis* ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (7.75 %) แมนโนส (42.19 %) กาแลคโตส (43.37 %) และอะราบิโนส (4.61 %) เป็นองค์ประกอบจึงจัดเป็นกาแลคโตแมนแนน (Kim and Yun, 2005) ส่วนพอลิเมอร์จาก *Rhizopus oryzae* ST29 เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือกลูโคสและโปรตีนเป็นองค์ประกอบ



ภาพที่ 12 HPLC chromatogram ของ (a) น้ำตาลมาตรฐาน ไซโลส, อะราบิโนส, ฟรุคโตส และกลูโคส (b) ไฮโดรไลซีสพอลิเมอร์จาก *Rhizopus oryzae* ST29 (c) *Cordyceps dipterigena* (d) *Cordyceps dipterigena*

Figure 12 HPLC chromatogram of (a) mix sugar standards xylose, arabinose, fructose and glucose (b) hydrolyzed of polymer from *Rhizopus oryzae* ST29 (c) *Cordyceps dipterigena* (d) *Cordyceps dipterigena*

3.4 คุณสมบัติการละลายของพอลิเมอร์

จากการทดสอบความสามารถในการละลายของพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* ในตัวทำละลาย 7 ชนิด (ตารางที่ 12) พบว่า พอลิเมอร์ทั้งหมดสามารถละลายได้ในน้ำแต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดที่ทดสอบ (เมทานอล เอทานอล อะซิโตน คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน เฮกเซน) โดยพอลิเมอร์จาก *Rhizopus oryzae* ST29 และ *Cordyceps dipterigena* ละลายน้ำได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่พอลิเมอร์จาก *Cordyceps nipponica* ละลายน้ำได้เพียงบางส่วนเท่านั้น

เมื่อพิจารณาลักษณะการละลาย พบว่า พอลิเมอร์จาก *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* มีการละลายในน้ำอย่างช้าๆโดย พอลิเมอร์จะขยายตัวออกโดยการพองตัว มีลักษณะคล้ายวุ้น เนื่องจากโมเลกุลของพอลิเมอร์เป็นโซ่ยาวมากหรือมีขนาดใหญ่มาก ดังนั้นกระบวนการเกิดการละลายของพอลิเมอร์จึงแตกต่างไปจากกระบวนการละลายของสารอินทรีย์โมเลกุลเล็กหรือมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ หลังการผสมพอลิเมอร์และตัวทำละลายเข้าด้วยกันแล้ว โมเลกุลของตัวทำละลายจะแพร่เข้าหาโมเลกุลของพอลิเมอร์อย่างช้าๆ เกิดการกระทำซึ่งกันและกันระหว่างโมเลกุลของตัวทำละลายกับพอลิเมอร์ โมเลกุลของพอลิเมอร์จะขยายตัวออกโดยการพองตัวขึ้นปรากฏลักษณะคล้ายวุ้น มีความเหนียวหนืด ถ้าแรงดึงดูดหรือการกระทำระหว่างโมเลกุลของตัวทำละลายและพอลิเมอร์มีมากพอ พอลิเมอร์ที่พองตัวนี้ค่อยๆขยายตัวออกไปอีกจนกระทั่งสามารถผสมกับโมเลกุลของตัวทำละลายอย่างเต็มที่เกิดการละลายพอลิเมอร์ที่แท้จริง เนื่องจากในกระบวนการละลายนี้ต้องแยกโมเลกุลของพอลิเมอร์ทั้งหลายออกจากกัน ดังนั้นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างเป็นร่างแหหรือพอลิเมอร์ที่มีความเป็นผลึกสูง หรือพอลิเมอร์ที่แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลสูง เช่นเกิดมีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลโดยพันธะไฮโดรเจน จะไม่เกิดกระบวนการละลายอย่างสมบูรณ์ พอลิเมอร์จะไม่ละลายหรือละลายได้น้อย แต่ปรากฏการพองตัวขึ้นซึ่งมีลักษณะคล้ายวุ้น (ชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์, 2526) ส่วนพอลิเมอร์จาก *Rhizopus oryzae* ST29 สามารถละลายน้ำได้เร็วกว่าพอลิเมอร์จาก *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* โดยไม่ปรากฏลักษณะการพองตัวของพอลิเมอร์

พอลิเมอร์จาก *Cordyceps nipponica* มีการละลายน้อยกว่าพอลิเมอร์จาก *Rhizopus oryzae* ST29 และ *Cordyceps dipterigena* เนื่องจากพอลิเมอร์จาก *Cordyceps nipponica* มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมาก โอกาสที่พอลิเมอร์และตัวทำละลายจะผสมกันได้เป็นอย่างดีย่อมมีน้อยกว่า โดยทั่วไปพอลิเมอร์ชนิดเดียวกันความสามารถในการละลายจะลดลงเมื่อพอลิเมอร์นั้นมีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น นอกจากนั้นโครงสร้างของพอลิเมอร์ก็มีผลต่อการละลายของพอลิเมอร์เช่นกัน ตัวอย่างเช่น พอลิเมอร์ชนิดเดียวกันแต่มีการแตกกิ่งสาขา (branched polymer) จะสามารถละลายได้ดีกว่าพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างเป็นโซ่ตรง ภายใต้สภาวะเดียวกัน (อุณหภูมิ ความดันและตัวทำละลายเดียวกัน) จากผล

การทดลองสรุปได้ว่าเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตและหลั่งสารพอลิเมอร์ชนิดที่ละลายน้ำออกสู่สิ่งแวดล้อมรอบๆ ตัวเซลล์ นอกจากนี้จากการที่พอลิเมอร์มีคุณสมบัติที่ไม่ละลายในตัวทำละลายหลายชนิด จึงสามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาถึงผลของตัวทำละลายต่อการตกตะกอนพอลิเมอร์เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด

ตารางที่ 12 คุณสมบัติในการละลายของพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica*

Table 12 Solubility of polymers from *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* and *Cordycepnipponica*

ตัวทำละลาย	การละลายของพอลิเมอร์		
	Rhizopus oryzae ST29	*Cordyceps dipterigena*	*Cordyceps nipponica*
น้ำกลั่น	++	++	+
DMSO	+	+	+
เมทานอล	-	-	-
เอทานอล	-	-	-
อะซิโตน	-	-	-
คลอโรฟอร์ม	-	-	-
ไดคลอโรมีเทน	-	-	-
เฮกเซน	-	-	-

หมายเหตุ ++ ละลายอย่างสมบูรณ์, + ละลายเพียงบางส่วน, - ไม่ละลาย

3.5 คุณสมบัติการเกิดเจล

3.5.1 ทดสอบการเกิดเจลของพอลิเมอร์

การเกิดเจลเกิดขึ้นเนื่องจากเมื่อนำของเหลวหรือตัวกลางซึมผ่านเข้าสู่พอลิเมอร์ น้ำที่เข้าไปจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ที่ชอบน้ำหรือหมู่ที่มีขั้วที่อยู่บนสายพอลิเมอร์ มีการสร้างพันธะเชื่อมไขว้กันไปมาภายในสายและระหว่างสายพอลิเมอร์ ทำให้สายพอลิเมอร์มีการคลายตัวหรือยืดขยายออกและเกิดโครงสร้างร่างแหแบบสามมิติที่พองตัวและยืดหยุ่นได้หรือเรียกว่าเกิดเจล

จากการทดสอบความสามารถในการเกิดเจลของพอลิเมอร์ ภายใต้สภาวะที่เป็นด่างเมื่อมี $CaCl_2.2H_20$ พบว่าพอลิเมอร์จาก *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* สามารถฟอร์มเจลได้ มีค่าความหนืดเท่ากับ 2,220 และ 3,122 cP ตามลำดับ (ตารางที่ 13) โดย *Cordyceps nipponica* สามารถฟอร์มเจลได้ดีกว่า ในขณะที่พอลิเมอร์จาก *Rhizopus oryzae* ST29 ไม่สามารถฟอร์มเจล โดยมีค่าความหนืดเท่ากับ 53 cP พอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Cordyceps nipponica* สามารถฟอร์มเจลได้ดีที่สุด เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (2862 kDa) โดยโมเลกุลขนาดใหญ่จะมีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลสูงและมีความหนืดมากกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก นอกจากนี้คุณสมบัติการเกิดเจลขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ หากใช้พอลิเมอร์ที่มีปริมาณน้อยอาจไม่สามารถสังเกตเห็นการเกิดเจลได้

ตารางที่ 13 ความหนืดของพอลิเมอร์จากเชื้อ *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica*

Table 13 Viscosity of polymers *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica*

Polymer from fungi	Viscosity (cP)
Rhizopus oryzae ST29	53
Cordyceps dipterigena	2220
Cordyceps nipponica	3122

3.5.2 ผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ต่อการเกิดเจล

จากการทดสอบผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ต่อการเกิดเจลโดยแปรผันความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่คัดเลือกได้คือ *Cordyceps nipponica* เป็น 1, 1.5 และ 2 % พบว่า ที่ความเข้มข้น 2%สามารถฟอร์มเจลได้ดีที่สุด โดยมีค่าความหนืดสูงสุด (ค่าความหนืด 8820 cP) (ตารางที่ 14) เจลที่ได้มีลักษณะคงตัวและยืดหยุ่นดี นอกจากนี้ความสามารถในการเกิดเจลยังขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ความเป็นกรดด่าง ความร้อน กระแสไฟฟ้า (มานิตา หาญพาณิชย์เจริญ, 2546)

ตารางที่ 14 ผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ต่อการเกิดเจลของพอลิเมอร์จากเชื้อ *Cordyceps nipponica*

Table 14 Effect of polymer concentration on gelation property of polymer from *Cordyceps nipponica*

ความเข้มข้น (%)	Viscosity (cP)
1	3122
1.5	6120
2	8820

3.5.3 ผลของพีเอชต่อการเกิดเจล

จากการทดสอบผลของพีเอชต่อคุณสมบัติการเกิดเจลโดยปรับพีเอชของสารละลายพอลิเมอร์ของเชื้อ *Cordyceps nipponica* ความเข้มข้น 2 % เป็น 8, 10 และ 12 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการฟอร์มเจลคือพีเอช 10 โดยพอลิเมอร์สามารถฟอร์มเจลได้ดีที่สุด มีค่าความหนืด 9890 cP (ตารางที่ 15) และการฟอร์มเจลจะลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 12 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Herman และคณะ 1989 ซึ่งอธิบายว่าพีเอชที่มากกว่า 7 มีผลเพิ่มความหนืดของแป้ง เนื่องจากเมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นด่างหมู่ฟังก์ชันคือหมู่ OH ของหน่วยย่อยอะมิโลเพคตินเกิดการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวใหม่โดยหมุนเปลี่ยนการจัดเรียงตัวจากแนวตั้ง (axial) เป็นแนวนอน (equatorial) ซึ่งการหมุนบิดระนาบเดี่ยวดังกล่าวนำไปสู่การขยายตัวของพอลิเมอร์ทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างมาก นอกจากนี้การพองตัวของเจลสามารถเพิ่มได้จากการเปลี่ยนแปลงระดับพีเอช ระดับความเข้มข้นของเกลือ (Colson *et al.*, 1974)

ตารางที่ 15 ผลของพีเอชต่อความหนืดของพอลิเมอร์จากเชื้อ *Cordyceps nipponica*

Table 15 Effect of pH on viscosity of polymer from *Cordyceps nipponica*

pH	Viscosity (cP)
8	7170
10	9890
12	8910

นอกจากนี้มีการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดเจลของพอลิเมอร์ ซึ่งการเกิดเจลที่มีความยืดหยุ่นนั้นจำเป็นต้องทำให้สายของพอลิเมอร์เกิดอันตกิริยาต่อกันมากที่สุด ปกติภายในสายโซ่พอลิเมอร์จะมีประจุที่แตกต่างกันจึงทำให้เกิดแรงดึงดูดและผลักกัน ดังนั้นการเติมสารที่ช่วยเสริมการเกิดอันตกิริยาระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์ จึงทำให้การเกิดเจลของพอลิเมอร์ดีขึ้น เช่น ผลของการเติมเกลือโซเดียม (Na^+) และคลอไรด์ (Cl^-) จับกับตำแหน่งผิวหน้าโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่มีประจุตรงข้าม จึงมีผลให้พันธะระหว่างขั้วไฟฟ้าระหว่างโมเลกุลถูกทำลาย ดังนั้นพอลิเมอร์จึงถูกแยกออกและกระจายตัวอยู่ในน้ำ นอกจากนี้เกลือยังมีผลต่อความแข็งแรงของเจลได้อีกด้วย (Ostroha *et al.*, 2004) จากการผลการทดสอบคุณสมบัติการเกิดเจลของพอลิเมอร์จากเชื้อ *Rhizopus oryzae, Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* พบว่าพอลิเมอร์จาก *Cordyceps nipponica* และ *Cordyceps dipterigena* สามารถฟอร์มเจลได้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่พบว่าพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์สามารถฟอร์มตัวเป็นเจลในสภาวะที่มีประจุ +2 ตัวอย่างเช่น carrageenan, alginate, xanthan gum และ gellan gum จะฟอร์มตัวเป็นเจลเมื่อมี Ca^{2+} มักใช้ในรูปเกลือ $CaCl_2$ เพราะให้เจลวุ้นเนื้อแน่นคุณภาพดี เช่นเดียวกับพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อ *Enterobactor* sp. เกิดเป็นเจลเมื่อมี $CaCl_2$, $MgSO_4$ และ $CuSO_4$ โดยเฉพาะเจลที่เกิดในสภาวะที่มี Cu^{2+} นั้นจะเป็นเจลที่มีความแข็งแรงมากที่สุด และพบว่ามีความแข็งแรงมากกว่า xanthan gum เมื่อทดสอบในสภาวะเดียวกัน (Shimada *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีการใช้ NaCl หรือ KCl เพื่อช่วยในการเกิดเจล เช่น gellan gum ซึ่งเป็นพอลิเมอร์จากจุลินทรีย์เช่นเดียวกันสามารถเกิดเจลได้เมื่อมี NaCl หรือ KCl แต่เจลที่ได้จะมีความทนทานต่อการนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบใช้ความดันไอต่ำกว่าการใช้สารจำพวก divalent คือ Mg^{2+} หรือ Ca^{2+} แต่เมื่อความเข้มข้นของอิเล็คโตรไลต์สูงขึ้นมากๆจะมีผลทำให้พอลิแซคคาไรด์ไม่ละลาย เนื่องจากสารจำพวกอิเล็คโตรไลต์นี้จะแย่งจับกับน้ำทำให้พอลิแซคคาไรด์แยกตัวออกจากน้ำ เป็นผลให้ความหนืดลดลง และอาจทำให้พอลิแซคคาไรด์ไม่ละลายได้เกิดการตกตะกอนออกมา เช่น scleroglucan ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตจากเชื้อรามีคุณสมบัติที่จะเกิดการตกตะกอนและไม่ละลายเมื่อมีความเข้มข้นของเกลือสูงเช่นดียวกัน (Kang and Pettitt, 1993)

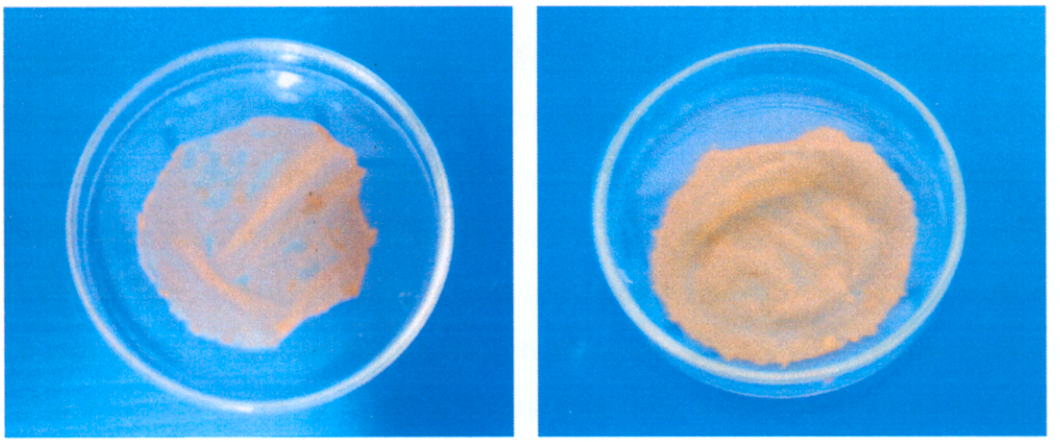
4. คุณสมบัติของฟิล์มจากพอลิเมอร์ของเชื้อรา

4.1 การทำแผ่นฟิล์มจากพอลิเมอร์

ฟิล์มเกิดขึ้นได้จากการทำให้สารที่สามารถเกิดฟิล์มได้ละลายหรือกระจายตัวแล้วใช้วิธีต่างๆในการแยกสารนั้นออกจากตัวทำละลาย เช่นการทำให้ตัวทำละลายระเหยไป การปรับความเป็นกรด-ด่าง หรือทำให้สารที่เกิดฟิล์มซึ่งหลอมเหลวแข็งตัว ฟิล์มมีองค์ประกอบหลักคือพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งมีคุณสมบัติเกิดฟิล์มได้ ตัวทำละลายและสารเจือปนซึ่งเติมลงไปเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของฟิล์ม (Kester and Fennema, 1986 อ้างโดย ธารทิพย์ หังสพฤกษ์, 2544)

จากการทดลองนำพอลิเมอร์จาก *Cordyceps nipponica* มาขึ้นรูปฟิล์มโดยเตรียมจากสารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 % เติมกลีเซอรอลเป็นพลาสติไซเซอร์ ซึ่งพลาสติไซเซอร์จะไปลดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของฟิล์ม และ เพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่ของสายพอลิเมอร์ ทำให้ฟิล์มมีสภาพยืดหยุ่นขึ้น แข็งแรงขึ้น ลดความเปราะ และทำให้ฟิล์มไม่เกิดการแตกยุ่ยเป็นชิ้นเล็กๆระหว่างการเก็บ (Krochta, 2000) โดยเติมพลาสติไซเซอร์ลงในสารละลายพอลิเมอร์ ระหว่างการละลายมีการกวนผสม จากนั้นจึงนำไปขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มและระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ความร้อนที่เหมาะสมในสภาวะที่ไม่รุนแรง (อบที่อุณหภูมิ 50^{o}C) เพราะถ้าใช้อุณหภูมิสูงจะมีผลทำให้อัตราการระเหยของตัวทำละลายเร็วเกินไป โมเลกุลของพอลิเมอร์จะถูกตรึงก่อนที่จะมีการรวมตัวกันอย่างเหมาะสมและต่อเนื่องอย่างสมบูรณ์ซึ่งจะมีผลทำให้ฟิล์มที่ได้มีรอยตำหนิ เช่น การเกิดเกิดรูเข็ม (pinholes) หรือทำให้ฟิล์มมีความหนาไม่สม่ำเสมอ ซึ่งจะมีผลทำให้ฟิล์มมีการซึมผ่านมากขึ้น (Banker, 1996) ผลการทดลองพบว่าฟิล์มที่เตรียมจากพอลิเมอร์ 1% มีลักษณะเปราะบาง กรอบ และฉีกขาดง่ายไม่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเป็นแผ่นฟิล์ม ส่วนแผ่นฟิล์มที่ได้จากพอลิเมอร์ 1.5 และ 2 % ให้ฟิล์มที่มีลักษณะสีขาวขุ่น (ภาพที่ 13) มีความอ่อนนุ่มยืดหยุ่นดี โดยเมื่อปริมาณพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นเป็น 2 % ฟิล์มที่ได้จะมีความขุ่นและหนามากขึ้น จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์บางชนิดผลิตเป็นฟิล์มหรือสารเคลือบที่รับประทานได้ เช่นแอลจิเนต เพกติน คาราจีแนน ไคโตซานและอนุพันธ์ของเซลลูโลส แต่เนื่องจากธรรมชาติของพอลิเมอร์เหล่านี้ชอบรวมกับน้ำ (hydrophillic) จึงไม่เหมาะที่จะนำฟิล์มชนิดนี้มาใช้ป้องกันการซึมผ่านความชื้น (มณฑาทิพย์ ยุ่นฉลาด, 2535)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดฟิล์มของพอลิมอร์มีหลายปัจจัยได้แก่ โครงสร้างของพอลิเมอร์ ตัวทำละลาย ความเข้มข้นของสารละลาย อุณหภูมิที่ใช้ระเหยตัวทำละลาย นอกจากนี้การขึ้นรูปฟิล์มส่วนใหญ่จะมีการเติมพลาสติไซเซอร์ ซึ่งมีผลให้คุณสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์เปลี่ยนแปลง เนื่องจากมีพันธะทุติยภูมิระหว่างพอลิเมอร์กับพลาสติไซเซอร์ ทำให้เกิดผลต่อเนื่องคือปฏิกิริยาระหว่างพอลิเมอร์กับพอลิเมอร์ลดลง เกิดการเคลื่อนที่ของสายพอลิเมอร์สูงขึ้น ความต้านทานแรงดึงของฟิล์มลดลง



ภาพที่ 13 ลักษณะของแผ่นฟิล์มที่ขึ้นรูปจากพอลิเมอร์จาก *Cordyceps nipponica* ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 % และ 2.0 %

Figure13 Appearances of film prepared from polymer produced by *Cordyceps nipponica* at concentration of 1.5% and 2%

ดังนั้นการเติมพลาสติไซเซอร์ทำให้ได้ฟิล์มที่มีลักษณะไม่เปราะ และมีความยืดหยุ่นสูงขึ้น ตัวอย่างพลาสติไซเซอร์เช่น โมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ โอลิโกแซคคาไรด์ โพลิออล และลิปิด ปริมาณการใช้พลาสติไซเซอร์โดยทั่วไปประมาณร้อยละ 10-60 โดยน้ำหนักแห้ง (Guibert, 1986) หากปริมาณพลาสติไซเซอร์มากเกินไปจะส่งผลต่อคุณสมบัติของฟิล์ม โดยจะทำให้สมบัติการซึมผ่านไอน้ำและสมบัติเชิงกลด้อยลง (เกศศิณี ตระกูลทิวากร, 2539) เช่นปริมาณกลีเซอรอลที่มากเกินไปไม่ทำให้ฟิล์มมีความยืดหยุ่นขึ้น หรือช่วยในการเตรียมฟิล์มดีขึ้น โดยกลีเซอรอลจะเพิ่มความยืดหยุ่นของแผ่นฟิล์มเมื่อผสมไปจนถึงปริมาณหนึ่ง และถ้าผสมเกินกว่านี้จะได้ฟิล์มที่มีสมบัติด้อยลง เนื่องจากปริมาณกลีเซอรอลที่สูงเกินไปจะไปขัดขวางการระเหยของน้ำจากแผ่นฟิล์ม ทำให้ได้แผ่นฟิล์มที่ได้ชื้นเหนอะหนะ

4.2 คุณสมบัติของแผ่นฟิล์ม

เมื่อนำแผ่นฟิล์มจากพอลิเมอร์ (1.5 และ 2 %) มาวัดความหนา ทดสอบความแข็งแรงของแผ่นฟิล์มโดยการทดสอบการต้านทานแรงดึง (tensile strength) และการยืดตัวเมื่อขาด (Elongation at break) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 16 พบว่าปริมาณพอลิเมอร์ที่เพิ่มขึ้นมีผลให้ความหนาของแผ่นฟิล์มเพิ่มขึ้น (พอลิเมอร์1.5 และ 2 % ให้ฟิล์มที่มีความหนา 0.08 และ 0.15 มิลลิเมตรตามลำดับ) เนื่องจากเมื่อปริมาณพอลิเมอร์เพิ่มมากขึ้นแต่ถูกจำกัดให้อยู่ในพื้นที่จำกัดจะทำให้เกิดการซ้อนทับกันของโมเลกุลจึงทำให้ความหนามากขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของพอลิเมอร์จะทำให้ฟิล์มมีความแข็งแรงขึ้นด้วย โดยการทดสอบสมบัติการต้านทานแรงดึงของ

ตารางที่ 16 ค่าความหนา การต้านทานแรงดึงขาด และการยืดตัวเมื่อขาดของพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Cordyceps nipponica*

Table 16 Thickness, tensile strength and elongation at break of polymer from *Cordyceps nipponica*

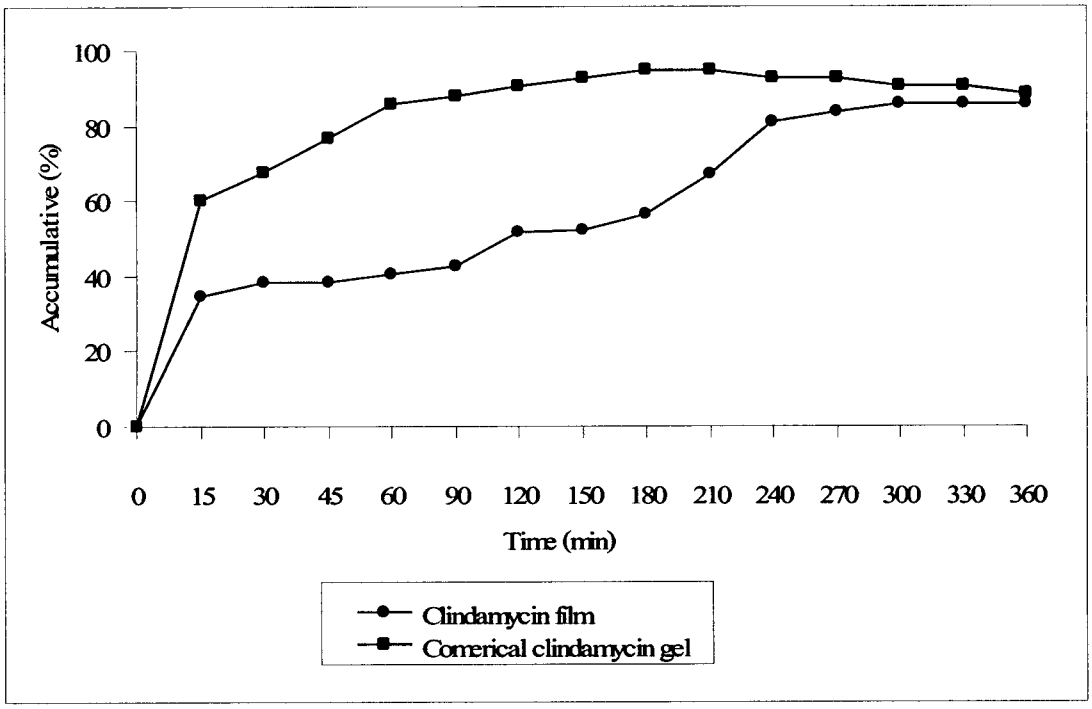
ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ (%)	ความหนา (mm)	การต้านทานแรงดึง (N/mm^2)	การยืดตัวเมื่อขาด (%)
1.5	0.08	0.138	44.9
2	0.15	0.668	50.7

4.3 การทดสอบการปลดปล่อยยาจากแผ่นฟิล์ม

เนื่องจากพอลิเมอร์ที่ได้มีคุณสมบัติทำเป็นแผ่นฟิล์มได้ จึงได้มีการประยุกต์ใช้ฟิล์มที่ได้ในการควบคุมการปลดปล่อยตัวยา เพื่อใช้สำหรับระบบนำส่งยาทางผิวหนัง ซึ่งเป็นช่องทางการนำส่งยาที่มีประสิทธิภาพทั้งที่ออกฤทธิ์เฉพาะที่และที่เข้าสู่กระแสเลือด ขึ้นอยู่กับระดับการติดเชื้อ องค์ประกอบหลักของระบบนำส่งยาทางผิวหนัง คือ ตัวควบคุมการปลดปล่อยตัวยา ซึ่งประกอบด้วย สารช่วยต่างๆ และพอลิเมอร์

การศึกษาการเตรียมยาในรูปแบบแผ่นฟิล์มซึ่งเตรียมจากพอลิเมอร์ที่ได้ เพื่อควบคุมการปลดปล่อยตัวยาคลินดามัยซิน โดยเปรียบเทียบกับเจลทางการค้าที่มีตัวยาคลินดามัยซินในปริมาณเท่ากัน (ความเข้มข้นของตัวยาในตำรับ 1%) เพื่อศึกษาถึงแนวโน้มของการปลดปล่อยยาคลินดามัยซินจากตำรับยา โดยใช้เครื่องทดสอบการละลาย (dissolution apparatus) พบว่าแผ่นฟิล์มที่ผสมยาคลินดามัยซิน และเจลคลินดามัยซินมีแนวโน้มการปลดปล่อยยาที่คล้ายกัน แต่ระยะเวลาและปริมาณที่ตัวยาถูกปลดปล่อยออกมาแตกต่างกัน โดยในแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ตัวยาจะถูกปลดปล่อยออกจากแผ่นฟิล์มอย่างช้าๆ (ภาพที่ 14) ซึ่งสามารถปลดปล่อยยาออกมามากกว่า 70 % ภายในเวลา 4 ชั่วโมง และหลังจากนั้นการปลดปล่อยยาค่อนข้างคงที่ ขณะที่เจลคลินดามัยซินทางการค้า ตัวยาจะถูกปลดปล่อยออกมาอย่างรวดเร็ว โดยสามารถปลดปล่อยยาออกมามากถึง 80 % ภายใน 2 ชั่วโมง จากนั้นการปลดปล่อยยาจะเป็นไปอย่างช้าๆ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเตรียมตำรับยาในรูปฟิล์ม โมเลกุลของพอลิเมอร์จัดเรียงตัวกันอย่างหนาแน่นตัวยาจึงค่อยๆ ละลายออกมาอย่างช้าๆ ขณะที่เจลมีลักษณะเป็นรูพรุนจึงเป็นการเพิ่มพื้นที่สัมผัสกับสารตัวกลางที่ใช้ทดสอบ ตัวยาจึงละลายออกมาอย่างรวดเร็วและเนื่องจากรูปแบบการปลดปล่อยยา โดยปกติจะผลิตให้ยามีการปลดปล่อยทันทีทันใดหรือให้เร็วที่สุด เพื่อให้มีการละลายและดูดซึมที่เร็ว ดังนั้นเจลคลินดามัยซินทางการค้าจึงมีลักษณะการปลดปล่อยยาที่รวดเร็ว ส่วนรูปแบบยาที่ดัดแปลงการปลดปล่อยยา เป็น

รูปแบบยาที่มีการออกแบบให้มีการปลดปล่อยตัวยาเพื่อผลการรักษา หรือเพื่อความสะดวกที่แตกต่างจากรูปแบบปกติ อาจออกแบบให้ลดความถี่ในการให้ยาลงโดยให้ปลดปล่อยยาอย่างช้าๆ (Extended-release) หรือมีการนำสารบางชนิดเช่น polymer ไปใช้ในการเคลือบยาเม็ด (Enteric-coated tablets) เพื่อให้เม็ดยานั้นไม่เกิดการแตกตัวในกระเพาะอาหารซึ่งมีสภาวะเป็นกรด แต่สามารถแตกตัวและปลดปล่อยตัวยาออกมาได้เมื่อเข้าสู่ลำไส้ ซึ่งมีสภาวะเป็นด่างเพื่อต้องการให้มีการดูดซึมที่ลำไส้เล็ก หรือหน่วงการปลดปล่อยไว้เพราะตัวยาอาจถูกทำลายได้ง่ายที่กระเพาะอาหาร หรืออาจมีฤทธิ์กัดกระเพาะอาหาร จึงต้องป้องกันไว้ไม่ให้ตัวยาถูกปลดปล่อยออกมาที่กระเพาะอาหาร (สุพงษ์ เอกศิริพงษ์, 2547) ดังนั้นการพัฒนาฟิล์มพอลิเมอร์ให้มีประสิทธิภาพในการปลดปล่อยยาจึงขึ้นอยู่กับรูปแบบที่ต้องการให้ปลดปล่อย และระดับของการรักษา โดยศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการปลดปล่อยยาในแต่ละรูปแบบ การเกิดปฏิกิริยาระหว่างยากับพอลิเมอร์ เพื่อพัฒนาตำรับยาให้มีคุณสมบัติเป็นระบบนำส่งยาที่มีประสิทธิภาพต่อไป



ภาพที่ 14 การปลดปล่อยตัวยาคลินดามัยซินของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Cordyceps nipponica*

Figure14 Dissolution profile of clindamycin of film polymer from *Cordyceps nipponica*

สัดส่วนของยาต่อพอลิเมอร์ที่ใช้เตรียมในตำรับยาเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดที่จะต้องคำนึงก่อนการผลิตยา โดยควรมีการหาสัดส่วนของปริมาณยาต่อพอลิเมอร์ที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ขนาดที่ปลดปล่อยออกมาตามระยะที่ต้องการ เมื่อเพิ่มปริมาณพอลิเมอร์จะมีผลให้อัตราการปลดล่อยยาช้าลง (เพ็ญนภา ภูวฤทธิ์, 2547) เช่นการทดลองใช้สเคอโรกลูแคนซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์จาก *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็นสารก่อเมทริกซ์ในการเตรียมยาเม็ดเพื่อชะลอการปลดปล่อยตัวยาทีโอฟิลลีนแอนฮัยดรัส ซึ่งเมื่อใช้สเคอโรกลูแคนปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 20 และ 30 % พบว่าโดยอัตราการปลดปล่อยยาช้าลงเมื่อปริมาณสเคอโรกลูแคนเพิ่มขึ้นจาก 20 % เป็น 30 % (Rizk *et al.*, 1994) สอดคล้องกับการทดลองของศรีสกุล สังข์ทองจีน และคณะ 2541 ที่ใช้เพคตินเพื่อชะลอการปลดปล่อยของตัวยาอินโดเมทาซิน โดยแต่ละตำรับมีปริมาณตัวยาและเพคตินที่อัตราส่วน 1 ต่อ 4, 1 ต่อ 6 และ 1 ต่อ 8 ตามลำดับ พบว่าเมื่อปริมาณของเพคตินเพิ่มขึ้นอัตราการปลดปล่อยตัวยาลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) เนื่องจากปริมาณเพคตินที่มากขึ้นจะเพิ่มเนื้อเมทริกซ์และเพิ่มความคดเคี้ยว (turtuosity) ในการแพร่ผ่านของตัวยาออกจากเม็ดยา จึงทำให้มีอัตราการปลดปล่อยตัวยาลดลง นอกจากนี้ความสามารถในการละลายน้ำของพอลิเมอร์ที่ใช้ในตำรับยามีผลต่อการปลดปล่อยตัวยา จากการศึกษาการใช้ฟิล์มเป็นรูปแบบยาเตรียมเพื่อควบคุมการปลดปล่อยยา เช่น การปลดปล่อยและการซึมผ่านผิวหนังจำลองของยาเมโทรนิดาโซลสำหรับนำส่งยาผ่านผิวหนัง โดยเตรียมในรูปฟิล์มเมทริกซ์ซึ่งเตรียมจากพอลิเมอร์จากธรรมชาติได้แก่ไคโตแซน พอลิเมอร์สังเคราะห์ได้แก่ยูราจิต (eudragit NE 30D) และส่วนผสมของพอลิเมอร์ทั้งสองในอัตราส่วนต่างๆ กัน (1:10, 1:20 และ 1:30) พบว่า การปลดปล่อยยาจากแผ่นฟิล์มไคโตแซนและฟิล์มที่มีส่วนผสมของไคโตแซนในอัตราส่วนที่สูงจะเป็นไปอย่างรวดเร็วภายใน 30 นาทีแรกจากนั้นการปลดปล่อยยาจะช้าลง เนื่องมาจากคุณสมบัติการพองตัวและการละลายน้ำของฟิล์มไคโตแซน โดยตัวยาจะถูกปลดปล่อยออกมามากกว่า 60 % ภายในเวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่ฟิล์มยูราจิตจะมีการปลดปล่อยยาช้าที่สุดและปริมาณยาที่ปลดปล่อยต่ำกว่า 60 % ภายใน 12 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติการไม่ละลายน้ำของฟิล์มยูราจิต และเมื่อทดสอบการซึมผ่านผิวหนังของยาแบบภายนอกร่างกายผ่านดราบงูในตัวกลาง phosphate buffer พีเอช 7.4 ที่เวลาต่างๆกัน พบว่ายามีการซึมผ่านเพียง 1-2 % ภายใน 12 ชั่วโมง (สุชาดา วรรณชนะ, 2545)

5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิเมอร์จากเชื้อรา

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* (ตารางที่ 17) โดยให้ผลทดสอบ ดังนี้

5.1 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

ผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ของพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า พอลิเมอร์จาก *Rhizopus oryzae* ST29 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี positive control คือ Rifampicin, Kanamycin และ Isoniazid ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 0.019, 1.25 และ 0.050 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่พอลิเมอร์จาก *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบ

ผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ของพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าพอลิเมอร์จากเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบ

5.2 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา (Antifungal activity)

ผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Candida albican* (ATCC 90028) ของพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* ที่ความเข้มข้น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าพอลิเมอร์จาก *Rhizopus oryzae* ST29 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี positive control คือ Amphotericin B ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.053 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่พอลิเมอร์จาก *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบ

5.3 กิจกรรมการยับยั้งมะเร็ง (Anticancer activity)

การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB (Oral human Human epidermoid carcinoma), NCI-H187 (Small cell lung cancer) และ (BC) Breast cancer ของพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าพอลิเมอร์จาก *Rhizopus oryzae* ST29 สามารถยับยั้งกิจกรรมของ Oral human epidermal carcinoma ได้ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถยับยั้งกิจกรรมของ Small cell lung cancer และ Breast cancer ได้ โดย positive control 2 ชนิดที่ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเซลล์เหล่านี้คือ Ellipticine ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.545, 0.595 และ 0.123 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ Doxorubicin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.095, 0.034 และ 0.138 ตามลำดับ

ตารางที่ 17 ฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิเมอร์จากเชื้อรา

Table 17 Biological activitys of polymer produed from fungi

การทดสอบ	ผลการทดสอบ (μg/ml)			positive control (μg/ml)
	R. oryzae ST29	*C. dipterigena*	*C. nipponica*	
กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย (*M.tuberculosis* H37Ra)	Active (MIC = 50)	Inactive	Inactive	Rifampicin (MIC = 0.019) Kanamycin (MIC = 1.25) Isoniazid (MIC = 0.050)
Staphylococcus aureus	Inactive	Inactive	Inactive	Penicilin
กิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา (*C. albican* ATCC 90028)	Moderate active IC_{50}=7.49	Inactive	Inactive	Amphotericin B (IC_{50} =0.053)
กิจกรรมการยับยั้งมะเร็ง				
● Oral human epidermal carcinoma	Moderate active IC_{50} = 5.20	Inactive	Inactive	Ellipticine (IC_{50} = 0.545), Doxorubicin (IC_{50} = 0.095)
● Small cell lung cancer	Inactive	Inactive	Inactive	Ellipticine (IC_{50} = 1.25), Doxorubicin (IC_{50} = 0.034)
● Breast cancer	Inactive	Inactive	Inactive	Ellipticine (IC_{50} = 0.050), Doxorubicin (IC_{50} = 0.138)

บทที่ 4

สรุป

1. การทียบเคียงชนิดของเชื้อราทนร้อน

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราทนร้อนสายพันธุ์ ST29 สามารถเทียบเคียงชนิดของเชื้อราได้เป็น *Rhizopus* sp. และเมื่อนำมาศึกษาทางชีวโมเลกุลเพื่อเทียบเคียงเชื้อราในระดับชนิด สามารถเทียบเคียงชนิดของเชื้อราได้เป็น *Rhizopus oryzae*

2. คุณลักษณะบางประการของพอลิเมอร์

น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Rhizopus oryzae* ST29, *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* เท่ากับ 26.7, 18.4 และ 2,862 กิโลดาลตันตามลำดับ

หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์จากเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ มีลักษณะเหมือนกันโดยสเปคตรัมเด่นๆของพอลิเมอร์เป็นตำแหน่งของหมู่คาร์บอนิล, ไฮดรอกซิล และอีเทอร์ จากสเปคตรัมดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าพอลิเมอร์จากเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ และเมื่อวิเคราะห์ชนิด, ปริมาณของน้ำตาล และปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าพอลิแซคคาไรด์จาก *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวคือน้ำตาลกลูโคส โดยมีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 911.02 และ 951.95 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ตามลำดับ ส่วนพอลิเมอร์จาก *Rhizopus oryzae* ST29 เป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำตาลกลูโคสและโปรตีนเป็นองค์ประกอบ (118.34 และ 108 มิลลิกรัมต่อกรัมพอลิเมอร์ ตามลำดับ)

พอลิเมอร์ที่ได้ไม่ละลายในตัวทำละลาย 6 ชนิดที่ทดสอบ แต่ละลายได้ในน้ำในระดับที่แตกต่างกันโดยพอลิเมอร์จาก *Rhizopus oryzae* ST29 และ *Cordyceps dipterigena* ละลายน้ำได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่พอลิเมอร์จาก *Cordyceps nipponica* ละลายน้ำได้เพียงบางส่วนเท่านั้น

พอลิเมอร์จาก *Cordyceps dipterigena* และ *Cordyceps nipponica* สามารถฟอร์มเจลได้ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง (pH 10) ที่มีเกลือ $CaCl_2.2H_20$ มีค่าความหนืด 2,220 cP และ 3,122 cP ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์และพีเอชต่อการเกิดเจล พบว่า พอลิเมอร์จาก *Cordyceps nipponica* สามารถฟอร์มเจลได้ดีที่สุด ค่าความหนืดเพิ่มขึ้นเป็น 9,890 cP ที่ความเข้มข้น 2.0 % พีเอช 10 และเมื่อนำพอลิเมอร์จาก *Cordyceps nipponica* (2%) มาขึ้นรูปฟิล์มโดยเติม

กลีเซอรอลเป็นพลาสติไซเซอร์ พบว่า ฟิล์มมีลักษณะอ่อนนุ่ม เหนียว และยืดหยุ่น มีค่าความต้านทานแรงดึงเท่ากับ 0.668 N/mm^2 และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาดเท่ากับ 50.7 % เมื่อนำแผ่นฟิล์มจากพอลิเมอร์ที่ได้มาศึกษาการปลดปล่อยยาคลินดามัยซิน โดยเปรียบเทียบกับเจลทางการค้าที่มีตัวยาคลินดามัยซิน พบว่า แผ่นฟิล์มพอลิเมอร์และเจลที่ผสมคลินดามัยซินมีแนวโน้มการปลดปล่อยยาที่คล้ายกันแต่ระยะเวลาและปริมาณที่ตัวยาถูกปลดปล่อยออกมาแตกต่างกัน โดยแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์จะปลดปล่อยตัวยาออกมาอย่างช้าๆ ในขณะที่เจลทางการค้ามีลักษณะการปลดปล่อยยาอย่างรวดเร็ว

3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิเมอร์จากเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า พอลิเมอร์ที่ผลิตจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ST29 สามารถยับยั้งการเจริญ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, *Candida albican* (ATCC 90028) และ Oral human epidermal carcinoma ได้ ในขณะที่พอลิเมอร์ที่ผลิตจากเชื้อรา *Cordyceps dipterigen* และ *Cordyceps nipponica* ไม่มีกิจกรรมการยับยั้ง

ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้งานวิจัยเกี่ยวกับพอลิเมอร์ชีวภาพจากเชื้อรามีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ควรมีการศึกษาถึงแหล่งอาหาร สภาวะที่ใช้ในการผลิตและปัจจัยอื่นๆที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์จากเชื้อรา
2. ควรมีการศึกษาถึงปัจจัยที่มีลต่อการควบคุมการปลดปล่อยยา เช่น สัดส่วนของยาต่อพอลิเมอร์ ความสามารถในการละลายของตัวยา สารที่ช่วยเติมในตำรับยา สารละลายตัวกลางที่ใช้ทดสอบ เพื่อให้แผ่นฟิล์มที่เตรียมได้มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นระบบนำส่งยาผ่านผิวหนัง

เอกสารอ้างอิง

เกศศิณี ตระกูลทิวากร. 2539. การทำฟิล์มที่รับประทานได้จากข้าวเจ้าและแป้งมันสำปะหลัง. ว. อาหาร. 26 (4): 249-262.

คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 2550. เทคโนโลยีคาร์โบไฮเดรต (ออนไลน์). สืบค้นจาก: http://eu.lib.kmutt.ac.th/elearning/Coursewa BCT611/chapter4_ 3.html) (29 มิถุนายน 2550).

จุไรรัตน์ นันทานิช. 2546. แนวทางการใช้ไคติน-ไคโตแซนในตำรับยาและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ. *ใน* เทคโนโลยีพอลิเมอร์เพื่อพัฒนาตำรับยาเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1 (มานี เหลืองธนะอนันต์, บรรณาธิการ). หน้า 105-132. ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

จินตนา ลีกิจวัฒน์. 2539. การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารโพลิเมอร์โดย GPC. ว.กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 44 : 23-24.

ชัยวัฒน์ เจนวาณิชย์. 2526. บทนำ: แนวคิดพื้นฐาน *ใน* พอลิเมอร์เชิงพาณิชย์. หน้า 1-80. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธารทิพย์ หังสพฤกษ์. 2544. การพัฒนาฟิล์มบริโภคได้จากแป้งบุกและการใช้ประโยชน์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธนะเศรษฐ์ ง้าวหิรัญพัฒน์. 2546. พอลิเมอร์สำหรับระบบนำส่งยาทางผิวหนัง. *ใน* เทคโนโลยีพอลิเมอร์เพื่อพัฒนาตำรับยาเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1 (มานี เหลือง ธนะอนันต์, บรรณาธิการ). หน้า 217-232. ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

เบญจมาศ ทรงพระ. 2547. ประสิทธิภาพและการจัดจำแนกเชื้อรา *Penicillium* spp. และ *Metarhizium* spp. ที่ทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยวิธีทางชีวโมเลกุล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปรีชา มุณีศรี. 2538. การบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้จุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และอรัญ หันพงษ์กิตติกุล. 2533. กระบวนการใช้ประโยชน์วัสดุเหลือทิ้งและคุณสมบัติของน้ำเสียของโรงงานน้ำมันปาล์ม. ว. สงขลานครินทร์. 12 (2): 169-176.

เพ็ญนภา ภูวฤทธิ์. 2547. แป้งข้าวเหนียวพรีเจลเพื่อใช้เป็นสารชะลอการปลดปล่อยยาสำหรับตำรับยาเม็ด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พรระวี สุมิตร. 2547. การศึกษาฟิล์มพอลิเมอร์ผสมชนิดรับประทานได้จากไคโตซานกับแป้งดัดแปรเอสเทอร์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พรรณทิพย์ ห่อศรีสัมพันธ์. 2548. FTIR เครื่องวิเคราะห์สารด้วยอินฟราเรด. ว. Lab Today. 4 : 33-39.

มานะ กาญจนมณีเสถียร. 2531. เชื้อราที่เจริญในอุณหภูมิสูงจากวัสดุบางชนิด และ key อย่างง่ายที่ใช้ในการจำแนก. ว. สงขลานครินทร์. 16: 83-92.

มานิตา หาญพาณิชย์เจริญ. 2546. พอลิเมอร์ทางเภสัชกรรม. ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มณฑาทิพย์ ยุ่นฉลาด. 2535. ฟิล์มและสารเคลือบที่รับประทานได้. ว. อาหาร. 22: 1-6.

ยอดหทัย เทพธรานนท์, ยุวพิน เลิศวีระวัฒน์, อมลยา จตุรภัทร, พนิดา พงศ์ภานุมาพร, รัชนีพร เจนวิถีสุข, ศรีสุดา ตระกูลน่าเลื่อมใส, อัมพร หรั่งรอด, ประสาท กิตตะคุปต์, ปัทมา พิทยขจรวุฒิ, ชะวะนี ศิริชัยวัฒน์, รัชดา จันทร์เพ็ญ, จักรพงศ์ อินทรอุดม, สุทธิชัย อินทมาตย์ และวาระดี วงศ์สวัสดิ์. 2544. สารออกฤทธิ์ชีวภาพจากพืชไทย. รายงานโครงการวิจัย. จิรวัฒน์เอกซ์เพรสจำกัด. กรุงเทพฯ.

ระพีพรรณ เติมตันท์. 2547. องค์ประกอบและคุณสมบัติของสารชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วสันต์ เพชรรัตน์ และมานะ กาญจนมณีเสถียร. 2533. ราที่เจริญในอุณหภูมิสูงและราทนร้อนจากปุ๋ยหมักสำหรับเพาะเห็ดฟาง. ว. สงขลานครินทร์. 12 (3): 233 - 228.

วารุณี บวรรัตโตภาค. 2546. การรวบรวมและเพาะเลี้ยง *Cordyceps* spp. จากอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ - ปุยจังหวัดเชียงใหม่. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วีรพันธ์ เดิมหลิ่ม และ พูนสุข ประเสริฐสรรพ์. 2540. สารตกตะกอนชีวภาพจากจุลินทรีย์. ว.สงขลานครินทร์. 19 : 239 – 254.

ศิริพร หมาดหล้า. 2543. การคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์ การจำแนกชนิดและคุณสมบัติของพอลิเมอร์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมลักษณ์ คงเมือง. 2546. หลักการเลือกใช้พอลิเมอร์ในการตั้งตำรับเจลและไฮโดรเจล. *ใน* เทคโนโลยีพอลิเมอร์เพื่อพัฒนาตำรับยาเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1 (มานี เหลือง ธนะอนันต์, บรรณาธิการ). หน้า 105-132. ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สุชาดา วรรณชนะ. 2545. ศึกษาการปลดปล่อยและการซึมผ่านผิวหนังจำลองของรูปแบบยาเตรียม (ฟิล์ม) methimazole สำหรับนำส่งยาทางผิวหนัง. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สุพงษ์ เอกศิริพงษ์. 2547. ชีวเภสัชศาสตร์. ห้างหุ้นส่วนจำกัดพิมพ์อักษร. กรุงเทพฯ.

สุวรรณี พนมสุข. 2546. บทบาทของพอลิเมอร์ในตำรับยา เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ. *ใน* เทคโนโลยีพอลิเมอร์เพื่อพัฒนาตำรับยาเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1 (มานี เหลืองธนะอนันต์, บรรณาธิการ). หน้า 1-9. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สุวิมล กีรติพิบูล, สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และ ฐิตาภา เขียวขจี. 2540. การผลิต Exopolysaccharides โดยใช้แบคทีเรียแลคติคและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร. รายงานผลการวิจัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศรีสกุล สังข์ทองจีน, ทัสนา พิทักษ์สุธีพงศ์, อรรถวิทย์ สมศิริ, พรศักดิ์ ศรีอมรรัตน์, ขวัญเรือน กาศแสวง และศันสนีย์ เครือรัตนไพบูลย์. การพัฒนาตำรับยาเม็ดเพคตินเมทริกซ์: ผลของแรงตอกและอัตราส่วนระหว่างตัวยากับเพคตินต่อการปลดปล่อยตัวยา. ว. มหาวิทยาลัยนเรศวร. 6 (2): 24-36.

หัสลินดา บินมะแอ. 2548. การบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์มด้วยเชื้อราทนร้อนที่ผลิตพอลิเมอร์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Arnard, H. B., Sveinsson, S. J. and Kristmunds, T. 1996. The release of clindamycin phosphate from a suspension of different types of liposomes and selected topical dosages forms. Int. J. Pharm.134: 71-77.

Anita, A. A. and Avinash, K. S. 1995. Studies on a viscous, gel-forming exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. Appl. Environ. Microbiol.: 1159-1162.

Aneli, M., Robert, F. H. and Marilsa, S. 2003. Structural characterization of *Botryosphaeran* sp.: β-Dglucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. Carbohydr Res. 338: 1691-1698.

A.O.A.C. 1990. Offical Methods of Analysis of the Assosiation of official Analytical Chemists 15 thed. The Association of official Analytical Chemists. Inc Verginia. Banker, G.S. 1996. Water vapor transmission properties of free polymer films. Int. J. Pharm. 18: 457-472.

ASTM. 1996. Standard test methods for water vapor transmission of materials. Standard E96-95. *In* Annual book of ASTM standards, Vol. 4. p. 697–704. Philadelphia, PA, USA.

Bae, J. T., Sinha, J., Park, J. P., Song, C. H. and Yun, J. W. 2000. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. J. Microbiol. Biotechnol. 10 : 482-487.

Banker. G. S. 1996. Water vapor transsion properties of free polymer films. J. Pharm. Pharmacol. 18: 457-472.

Benjamin, R. K., Blackwell, M., Chapela, I. H., Humber, R. H., Jones, K. G., Klepzig, K. A., Lichtward, R. W., Malloch, D., Noda, H., Rocper, R. A., Spatapora, J.W. and Wcir, A. 2000. The search for diversity of insect and other arthropod-assosiated fungi (Online). Available http://www. 1sb380.plbio.edu/Chapter%2015 (2000, October 29)

Blakeney, A. B., Harris, P. J., Henry, R. J. and Stone, B. A. 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharides analysis. Carbohydr Res. 113: 291–299.

Cha, S. H., Lim, J. S., Yoon, C. S., Koh, J. H., Chang, H. I. and Kim, S.W. 2007. Production of mycelia and exo-biopolymer from molasses by *Cordyceps sinensis* 16 in submerged culture. Bioresource Technol. 98: 165-168.

Chen, Y. J., Shiao, M. S., Lee, S. S. and Wang, S.Y. 1997. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. Life Sci. 60: 2349-2359.

Chen, S. C., Lu, M. K., Cheng, J. J. and Wang, D. L. 2005. Antiangiogenic activities of polysaccharides isolated. FEMS Microbiol. Lett. 249: 247-254.

Collins, E. A., Bares, J. and Billmeyer, F.W. 1973. Experiments in polymer science. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Collins, L. A. and Franzblau, S. G. 1997. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 1004-1009.

Colson P, Jennings H. J, Smith I. C. 1974. Composition, sequence, and conformation of polymers and oligomers of glucose as revealed by carbon-13 nuclear magentic resonance. J. Am. Chem. Soc. 96:8081-8087

Destefano, R.H.R. 2004. Detection and identification of *Metarhizium anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* larvae using specific primers (Online). Available http://www.teses.usp.br/teses.ups.br/teses/disponiveis/11/11138/+de15072003141752/publico/ricardo.pdf (2004, April 4)

Dermlim, W. 1999. Screening for polymer-producing bacteria from seafood activated sludge and bioflocculant characterization. Master of Science Thesis in Biotechnology. Prince of Songkla University.

Diaz-Guerra, T. M., Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., Gaztelurrutia, L., Navarro, J. I. and Tudela, J. L. 2000. Genetic similarity among one *Aspergillus flavus* strain isolated from a patient who underwent heart surgery and two environmental strains obtained from the operating room. J. Clin. Microbiol. 38: 2419-2422.

Evans, H. C. 1974. Natural control of arthropods with special reference to ants (Formicidae) by fungi in tropical high forest of Ghana. J. Appl. Ecol. 11: 37-49.

Gibbs, P. A. and Sevior, R. J. 1996. Does the agitation rate/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Auriobacidium pullulans* in batch culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 503-510.

Guibert, S. 1986. Technology and application of edible protective films. Elsevier Applied Science Publishing Co., London, p 545.

Herman, J., Remon, J. P. and Vilder, D. 1989. Modified starches as hydrophilic matries for controlled oral delivery I:production and characterissation of thermally modified starches. Int. J. Pharm. 56: 51-63.

Huang, G. L., Liua, M. X. and Mei, X.Y. 2004. Synthesis, (1.3)-β-D-glucanase-binding ability and phytoalexinelicitor activity of a mixture of 3,4-epoxybutyl (1.3)- β-D-oligoglucosides. Carbohydr Res. 339: 1453-1457.

Hywel-Jones, N. L. 1993. Torrubiella luteorostrata a phatogen of scale insects and its association with *Paccilormyces cinnamomeus* with a note on Torrubiella tenuis. Mycol. Res. 97: 1126-1130.

Isaka, M., Tanticharoen, M., Kongsaeree, P. and Thebtaranonth, Y. 2001. Structure of cordypyridones A-D, antimalarial N-hydroxy and N-methoxy-2-pyridones from the insect pathogenic fungal Cordyceps nipponica. J. Org. Chem. 66: 4803-4808.

Jenning, D. H. 1995. The physiology of fungal nutrition. New York. Cambridge University Press.

Kang, K. S. and Pettitt, D. J. 1993. Xanthan, gellan, welan, and rhamsan. *In* Industrial gums: polysaccharides and their derivatives. (Whistler, R.L. and BeMiller, J.N., ed.). p. 341-397. Academic Press, San Diego.

Kiho, T., Yamane A., Hui, J., Usui, S. and Ukai, S. 1996. Polysaccharide in fungi: Hypoglycemic activity of polysaccharide (CS-F30) from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. Biol. Bull. 19 : 294-296.

Kim, K. W., Ko, C. J. and Park, H. J. 2002. Mechanical properties, water vapor permeabilities and solubilities of highly carboxymethylate starch-based edible films. J. Food Sci. 67: 218-222.

Kim, H. O. and Yun, J. W. 2005. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. J. Appl. Microbiol. 99: 728-738.

Kim, S. W., Hwang, H. J., Xu, C. P., Sung, J. M., Choi, J. W. and Yung, J. W. 2003. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. J. Appl. Microbiol. 94: 120-160.

Kim, S. W., Xu, C. P., Hwang, H. J., Choi, J. W., Kim, C. W. and Yun, J. E. 2003. Exopolysaccharides from an enthomopathogenic fungus *Cordyceps militaris* NG3. Biotechnol. Prog. Biotechnol. Prog.19: 428-435.

Kittakoop, P., Punya, J., Kongsaeree, P., Lertwerawat, Y., Jintasirikul, A., Tanticharoen, M. and Thebtaranonth, Y. 1999. Bioactive naphthoquinones from *Cordyceps unilateralis.* Phytochemistry. 52: 453-457.

Krochta, J. M. 2000. Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emuision films. J. Agric. Food Chem. 48: 2687-2692.

Li, S. P., Zhao, K. J., Ji, Z. N., Song, Z. H., Dong, T. T. X., Lo, C. K., Cheung, J. K. H., Zhu, S. Q. and Tsim, K. W.K. 2003. A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional chinese medicine, protects PC 12 cells against hydrogen peroxide-induced injury. Life Sci. 73: 2503-2513.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Madi, N., McNeil, B. and Harvey, L. M. 1997. Effect of exogenous calcium on morphology development and biopolymer synthesis in the fungus *Auriobacidium pullulans.* Enzyme Microb. Technol. 21: 102-107.

Madla, S., Methacanon, P., Prasitsil, M. and Kirtikara, K. 2005. Characterization of bio compatible fungi-derived biopolymers that induce IL-8 production. Carbohydr. polym. 59: 275-280.

Martin, A., Bustamante. P. and Chun, A.H.C. 1993. Physiscal pharmacy. 4th Ed. Lea-Febiger. Philadelphia.

Morin, A. 1998. Screening of polysaccharide microorganism, factors influencing the production, and recovery of microbial polysaccharides. *In* polysaccharides : Structure diversity and functional versatility. (Dumitriu, S.,ed.). p. 275-296. Marcel Dekker. New York .

Odain, G. 1991. Introduction. *In* Principles of Polymerization. 3rded. p. 19-24. John Wliey & Sons, Inc. New York.

Oh, J. Y., Cho, E. J., Nam, S. H., Choi, J. W. and Yun, J. W. 2007. Production of polysaccharide-peptide complexes by submerged mycelial culture of an entomopathogenic fungus *Cordyceps sphecocephala*. Process Biochem. 42: 352-362.

Ostroha, Y., Pong, M., Lowman, A. and Dan, N. 2004. Controlling the collapase/swelling transition in charged hydrogel. Biomaterials. 25: 4345-4353.

Park, J. P., Kim, S.W., Heang, H. J. and Yun, J.W. 2001. Optimization of submerged culture conditions for the mycelia growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militrais*. Lett. Appl. Microbiol. 33: 76-80.

Pechsuth, M., Persertsan, P. and Ukita, M. 2001. Biopretreatment of palm oil mill effluent by thermotolerant polymer-producing fungi. Songklanakarin J. Sci. Technol. 23 (suppl.): 771-777.

Plumb, J.A., Milroy, R. and Kaye, S.B. 1989. Effect of the pH dependence of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a Novel Tetrazolium-based Assay. Cancer Res. 49: 4435-4440.

Presertsan, P., H-Kittikul, A. and Chitmanee, B. 2001. Islation and selecton of cellulolytic fungi from plam oil mill effluent. World J. Microbiol. Biotechnol. 8(6): 614-617.

Prasertsan, P. and Oi, S. 2001. Enzymatic saccharification of hemicellulose. Songklanakarin J. Sci. Technol. 23 (Suppl.): 789-795.

Razak, C.N.A., Salleh, A. B., Musani, R., Samad, M. Y. and Basri, M. 1996. Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. J. Mol. Catal. B: Enzymatic. 3: 153-159.

Rew, Y. H., Jo, W. S., Jeong, K. C., Yoon, J. T. and Choi, B. S. 2000. Cultural characteristics and fruitingbody formation of *Phellinus gilvus*. J. Mycol. 28: 6-10.

Rizk, S., Duru, C., Gaudy, D., Jacob, M. 1994. Natural polymerh matrix : druge release factors. Drug Dev., Ind. Pharm. 20: 2563-2574.

Rosiak, J. M. and Ulanski, P. 1999. Synthesis of hydrogel by irradiation of polymers in aqeous solution. Radiat. Phys. Chem. 55:139-151.

Sawayanaki, Y., Nambu, N. and Nagai, T. 1982. Direct compressed tablets containing chitin or chitosan in addition to lactose or potato starch. Chem. Pharm. Bull. 30: 2935-2940.

Selbmann, L., Onfri, S., Fenice, M., Federici, F. and Petruccioli, M. 2002. Product and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. Microbiol. Res. 153: 585-592.

Selbmann, L., Stingele, F. and Petruccioli, M. 2003. Exopolysaccharide production by filamentous fungi: the example of *Botryosphaeria rhodina*. Antonie Leeuwenhoek. 84: 135-145.

Shimada, A., Nakata, H. and Nakamura, I. 1997. Acidic exopolysaccharide produces by *Enterobacter* sp. J. Ferment. Bioeng. 84: 113-118.

Singh, V. B., Kumar, A., Isaac Kirubakaran, S., Ayyadurai, N., Sunish Kumar, R. and Sakthivel, N. 2006. Comparison of exopolysaccharides produced by *Xanthomonas oryzae* strains, BXO1 and BXO8 that showv degrees of virulence in rice. J. Phytopath. 154: 410–413.

Skehan, P., Ritsa, S. and Dominic, S. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay fora-drug screening. J Natl Cancer Inst. 82: 1107-1112.

Somrutai, W., Takagi, M. and Yoshida, T. 1996. Acetone-butanol fermentation by *Clostridium aurantibutyricum* ATCC 17777 from a model medium forpalm oil mill effluent. J. Ferment Bioengineer. 81: 543-547.

Sutherland, I. W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. Trends Biotechnol. 16: 41-46.

Sutton, D. A., Fothergill, A. W. and Rinaldi, M. G. 1998. Guide to Clinically Significant Fungi. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. USA.

Tallon, R., Bressollier, P. and Urdaci, M. C. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. Res. Microbiol. 154: 705-712.

Vashitz, D. and Steintuch, M. 1989. Mass transfer studies using cloned-luminous strain of *Xantomonas campestris*. Biotechnol. Bioeng. 34: 671-680.

Vashuk, E. V., Vorobieva, E. V., Basalyga, I. I. and Krutko, N. P. 2001. Water absorbing properties of hydrogels based on polymeric complexes. Mat. Res. Innovat. 4: 350-352.

Wan, L. S. C., Heng, P. W. S. and Wong, L. F. 1991. The effect of hydroxypropylmethylcellulose on water penetration into a matrix system. Int. J. Pharm. 73: 111-116.

West, T. P. and Strohfus, B. 1997. Effect of manganese on polysaccharide production and cellular pigmentation in the fungus *Auriobacidium pullulans*. World J. Microbiol. Biotechnol. 13: 233-235.

Whistler, R. L. 1996. Polysaccharide. *In* Encyclopedia of Polymer Science and Technology. Vol. 11. (ed. By Mark, H. F., Gaylord, N. G. and Bikales, N. M.). John Wiley & Sons, Inc. New York.

Xiao, J. H., Chen, D. X., Liu J. W., Liu, Z. L., Wan, W. H., Fang, N., Xiao, Y., Qi, Y. and Liang, Z. Q. 2004. Optimization of submerged culture requirements for the production of mycelial growth and exopolysaccharide by *Cordyceps jiangxiensis* JXPJ 0109. J. Appl. Microbiol. 96: 1105-1116.

Xiao, C., Gao, S., Wang, H. and Zhang, L. 2000. Blend films from chitosan and konjac glucomannan. J. Appl. Polym. Sci. 76: 509-515.

Xu, C. P. and Yun, J. W. 2003. Optimization of submerged-culture conditions for the mycelia growth and exo-biopolymer production by *Auricularia polytricha* (wood ears fungus) using the method of uniform design and regression analysis. Biotechnol. Appl. Biochem. 38: 193 - 199.

Yu, R., Wang, L., Zhang, H., Zhou, C. And Zhao, Y. 2004. Isolation, purification and identification of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris*. Fitoterapia. 75: 662-666.

Zhang, M., Cui, S. W., Cheung, P. C. K. and Wang, Q. 2006. Antitumor polysaccharides from mushrooms : a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. Trends Food Sci. Technol. 18: 4-19.

Zhang, D., Wang, J. and Pan, X. 2006. Cadmium sorption by EPS produced by anaerobic sludge under sulfate-reducing conditions. J. Hazard. Mater.138: 589-593.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสูตร Potato dextrose broth (PDB) ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเด็กซ์โตส	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

2. อาหารสูตร Potato dextrose agar (PDA) ให้เติมผงวุ้น 15 กรัม

3. Sabouraud dextrose agar (SDA) ประกอบด้วย

นีโอเปปโตน	10	กรัม
น้ำตาลเด็กซ์โตส	40	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

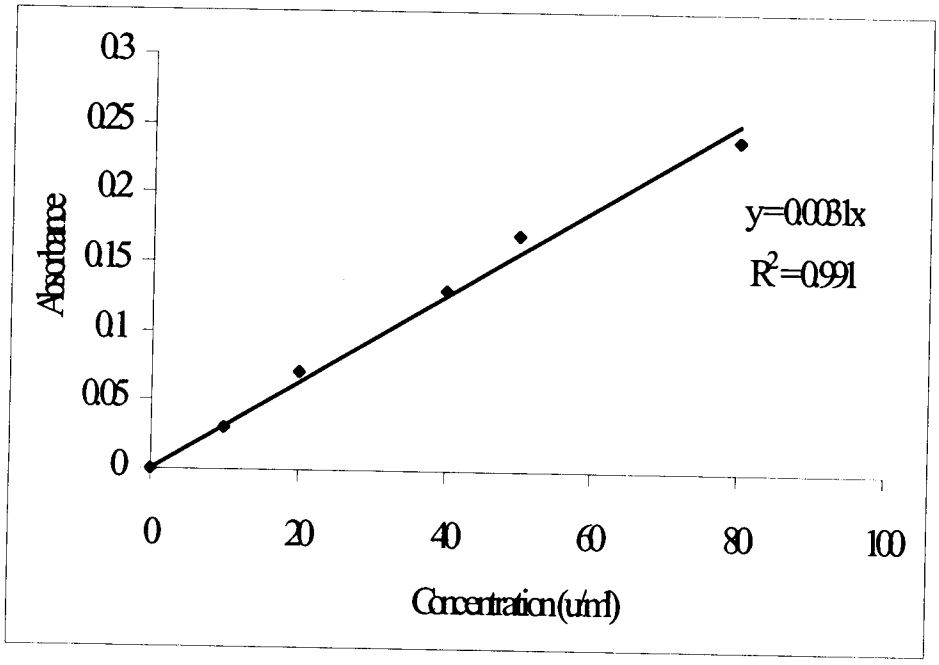
4. อาหารสังเคราะห์จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (POME synthetic medium) ประกอบด้วย

น้ำมันปาล์ม	12.3	กรัม
เซลลูโลส	4.7	กรัม
ไซแลน	2.5	กรัม
แป้ง	4.8	กรัม
น้ำตาลอะราบิโนส	3.0	กรัม
ไซโลส	0.20	กรัม
กลูโคส	0.1	กรัม
กาแลคโตส	0.07	กรัม
เคซีน	5.2	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.3	กรัม
$MnSO_4.6H_2O$	0.02	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.02	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Glycine	0.01	กรัม
L-Histidine	0.015	กรัม
L-Hydroxyproline	0.02	กรัม
L-Isoleucine	0.05	กรัม
L-Leucine	0.05	กรัม
L-Lysine.HCL	0.04	กรัม
L-Methionine	0.015	กรัม
L-Phenylalanine	0.015	กรัม
L-Proline	0.02	กรัม
L-Serine	0.03	กรัม
L-Threonine	0.02	กรัม
L-Tryptophan	0.005	กรัม
L-Tyrosine	0.02	กรัม
L-Valine	0.02	กรัม
- Vitamins		
p-Aminobenzoic Acid	0.001	กรัม
Biotin	0.0002	กรัม
D(+)-Ca-Pantothenate	0.00025	กรัม
Choline Chloride	0.003	กรัม
Folic acid	0.001	กรัม
myo-Inositol	0.035	กรัม
Nicotinamide	0.001	กรัม€
Pyridoxine.HCl	0.001	กรัม
Riboflavin	0.0002	กรัม
Thiamine.HCl	0.001	กรัม
Vitamin B12	0.000005	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข.

ศึกษาการปลดปล่อยยาจากแผ่นฟิล์มโดยใช้เครื่องทดสอบการละลาย (dissolution apparatus)



ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานของคลินดามัยซิน ใน phosphate buffer พีเอช 7.4

Figure 15 Standard curve of clindamycin in phosphate buffer pH 7.4

ผลการทดลองการปลดปล่อยตัวยาจากแผ่นฟิล์มคลินดามัยซินและเจลคลินามัยซินทางการค้า

ตารางที่ 18 การปลดปล่อยตัวยาจากแผ่นฟิล์มคลินดามัยซิน

Table 18 Drug release from clindamycin film

Time (min)	Absorbance	Concentration (g/ml)	Drug release (g)	Drug release (%)
0	0	0	0	0
15	0.016	5.1613×10^{-6}	0.000516	34.41
30	0.017	5.4839×10^{-6}	0.000574	38.28
45	0.017	5.4839×10^{-6}	0.000576	38.39
60	0.018	5.8065×10^{-6}	0.000608	40.54
90	0.019	6.1290×10^{-6}	0.000642	42.80
120	0.023	7.4194×10^{-6}	0.000773	51.51
150	0.023	7.4194×10^{-6}	0.000779	51.94
180	0.025	8.0645×10^{-6}	0.000844	56.24
210	0.03	9.6774×10^{-6}	0.001008	67.20
240	0.036	1.1613×10^{-5}	0.001210	80.65
270	0.037	1.1935×10^{-5}	0.001252	83.44
300	0.038	1.2258×10^{-5}	0.001285	85.70
330	0.038	1.2258×10^{-5}	0.001287	85.81
360	0.038	1.2258×10^{-5}	0.001287	85.81

ตัวอย่างการคำนวณการปลดปล่อยตัวยา

จากสมการจากกราฟมาตรฐานคลินดามัยซินใน phosphate buffer พีเอช 7.4

$Y = 0.0031x$

เมื่อ X คือค่าความเข้มข้น

และ Y คือค่าการดูดกลืนแสง

ที่เวลา 15 นาที สารละลายมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.016

แทนค่าลงในสมการจะได้ $0.016 = 0.0031x$

$x = 5.1613 \times 10^{-6}$ g/ml

ปริมาตรของ dissolution (phosphate buffer) ที่ใช้คือ 100 ml

ดังนั้นที่เวลา 15 นาที จะมีปริมาณยาใน phosphate buffer $= 5.1613 \times 10^{-6}$ g/ml x 100 ml

$= 0.000516$ g

ที่เวลา 30 นาที สารละลายมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.017

แทนค่าลงในสมการจะได้ $0.017 = 0.0031x$

$x = 5.4839 \times 10^{-6}$ g/ml

ปริมาตรของ dissolution (phosphate buffer) ที่ใช้คือ 100 ml

ดังนั้นที่เวลา 30 นาที จะมีปริมาณยาใน phosphate buffer $= 5.4839 \times 10^{-6}$ g/ml x 100 ml

$= 0.000548$ g

เนื่องจากที่เวลา 15 นาทีได้ปีเปตสารละลายออกไป 5 ml ซึ่งจะมีตัวยาหายไป

$= 5.1613 \times 10^{-6}$ g/ml x 5 ml

$= 2.5806 \times 10^{-5}$ g

ดังนั้นที่เวลา 30 นาทีจะมีปริมาณยาใน phosphate buffer $= 0.000548$ g $+ 2.5806 \times 10^{-5}$ g

$= 0.000574$ g

สำหรับเวลาที่เหลือ 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360 คิดเช่นเดียวกับเวลาที่ 30

ตารางที่ 19 การปลดปล่อยตัวยาจากเจลคลินดามัยซินทางการค้า

Table 19 Drug release from comerical clindamycin gel

Time (min)	Absorbance	Concentration (g/ml)	Drug release (g)	Druḡ release (%)
0	0	0	0	0
15	0.028	9.03226×10^{-6}	0.0009	60.22
30	0.030	9.67742×10^{-6}	0.0010	67.53
45	0.034	1.09677×10^{-5}	0.0011	76.34
60	0.038	1.22581×10^{-5}	0.0013	85.38
90	0.039	1.25806×10^{-5}	0.0013	87.96
120	0.040	1.29032×10^{-5}	0.0014	90.22
150	0.041	1.32258×10^{-5}	0.0014	92.47
180	0.042	1.35484×10^{-5}	0.0014	94.73
210	0.042	1.35484×10^{-5}	0.0014	94.84
240	0.041	1.32258×10^{-5}	0.0014	92.69
270	0.041	1.32258×10^{-5}	0.0014	92.58
300	0.040	1.29032×10^{-5}	0.0014	90.43
330	0.040	1.29032×10^{-5}	0.0014	90.32
360	0.039	1.25806×10^{-5}	0.0013	88.17

ตัวอย่างการคำนวณการปลดปล่อยตัวยาที่เวลาต่างๆ คิดเช่นเดียวกับการปลดปล่อยตัวยาจากแผ่นฟิล์มคลินดามัยซิน

5. อาหารสูตร Middlebrook 7H9 ประกอบด้วย

$(NH_4)SO_4$	0.5	กรัม
$C_5H_9NO_4$	0.5	กรัม
$C_6H_5Na_3O_7$	0.1	กรัม
Pyridoxin	0.001	กรัม
Biotin	0.0005	กรัม
$NaHPO_4$	2.5	กรัม
$NH_3FeC_6H_5O_7$	0.04	กรัม
$MgSO_4$	0.05	กรัม
$CaCl_2$	0.005	กรัม
$ZnSO_4$	0.001	กรัม
Cu_2SO_4	0.001	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

6. อาหารสูตร Middlebrook 7H9 ประกอบด้วย RPMI1640

- Inorganic salts		
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	0.1	กรัม
KCI	0.4	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	กรัม
$NaHCO_3$	2.0	กรัม
$Na_2HPO_4.7H_2O$	2.5	กรัม
$NH_3FeC_6H_5O_7$	1.512	กรัม
- Other components		
Glucose	2.0	กรัม
Glutathione reduces	0.001	กรัม
Phenol red Na	0.0053	กรัม
- Amino acids		
L-Arginine	0.2	กรัม
L-Asparagine	0.05	กรัม
L-Aspartic Acid	0.02	กรัม
L-Cystine	0.05	กรัม
L-Glutamin Acid	0.02	กรัม

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสุภวดี สุยะลา

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4782044

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี	2542

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

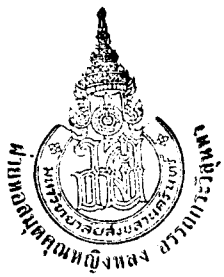
- ทุนพัฒนาอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนวิจัยมหาบัณฑิตสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Suyala, S., Hongpattarakeeree, T. and Prasertsan, P. Identification of Polymer Produced Thermotolerant Fungi Cultivated in Palm Oil Mill Effluent and Effect of Temperature on Separation of its Polymer. The First Joint PSU-UNS International Conference on Bioscience: Food, Agriculture and the Environment on 17-19 August 2006, Hat Yai, Thailand (poster presentation).

Suyala, S., Prasertsan, P. and Hongpattarakeeree, T. Characterization of Polymer from Fungi. The 2 nd International Conference on Fermentation technology for Value Added Agricultal Products on 24-25 May 2007. Kosa Hotel, Khon Kaen Thailand (oral presentation).

[redacted]
778044
หอสมุดกลาง



BIB Key.....

ว
QP801.B69
ส74
2550
ฉ.1

สุภาดี สุยะลา
คุณลักษณะและการประยุกต์ใช้พอลิเมอร์จากเชื้อรา /สุภาดี สุยะลา