สารประกอบยับยั้งจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 ที่แยกจากเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* ในจังหวัดกาญจนบุรี

นายภูมินันท์ ทัดเทียม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-3965-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTIMICROBIAL COMPOUNDS OF ENDOPHYTIC FUNGUS STRAIN KBLM13 ISOLATED FROM *Croton oblongifolius* IN KANCHANABURI PROVINCE

Mr. Bhuminan Tadtheam

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-17-3965-6

481762

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สารประกอบยับยั้งจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 ที่แยกจากเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* ในจังหวัดกาญจนบุรี
โดย	นายภูมินันท์ ทัดเทียม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล

คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เริงสำราญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์)

ภูมินันท์ ทัดเทียม : สารประกอบยับยั้งจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 ที่แยกจากเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* ในจังหวัดกาญจนบุรี (ANTIMICROBIAL COMPOUNDS OF ENDOPHYTIC FUNGUS STRAIN KBLM13 ISOLATED FROM *Croton oblongifolius* IN KANCHANABURI PROVINCE) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. สุรชัย พรภคกุล, 144 หน้า. ISBN 974-17-3965-6

ราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM 13 ที่แยกมาจากเปล้าใหญ่ในจังหวัดกาญจนบุรี เป็นราที่สร้างสารที่มีทธิ์ยับยั้งจุลชีพ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่บ่งชี้ว่าเป็นราเอ็นโดไฟต์ *Xylaria* sp. เมื่อนำราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Sabouraud's Dextrose Broth (SDB) แล้วนำมาสกัดและแยกสารที่ราสร้างขึ้นด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและการตกผลึกได้สาร 3 ชนิด ประกอบด้วย สารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติใหม่ 2 ชนิด จากสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตของเส้นใยและสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตของน้ำเลี้ยงเชื้อ คือ (*S*)-(+) mellein methyl ether และ Cyclo[Gly-(*S*)-Pro] ตามลำดับ และ Cyclo-(L)-Pro-(L)-Val สารที่ได้จากสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตของน้ำเลี้ยงเชื้อ ฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของสารทั้ง 3 ชนิด ทดสอบด้วยวิธี Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) พบว่า (*S*)-(+) mellein methyl ether มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุด ที่ค่า MIC เท่ากับ 62.5 (325.18) และ 62.5 (325.18) µg / ml (µM) ตามลำดับ Cyclo-(L)-Pro-(L)-Val มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด ที่ค่า MIC เท่ากับ 7.82 (39.86) µg /ml (µM) และ Cyclo[Gly-(*S*)-Pro] มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ที่ค่า MIC เท่ากับ 125 (811.16) และ 125 (811.16) µg / ml (µM) ตามลำดับ

สาขาวิชา .....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2548…….. ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4572474223: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: ENDOPHYTIC FUNGI / THE XYLARIACEAE / *Croton oblongifolius* / ANTIMICROBIAL ACTIVITY

BHUMINAN TADTHEAM: ANTIMICROBIAL COMPOUNDS OF ENDOPHYTIC FUNGUS STRAIN KBLM13 ISOLATED FROM *Croton oblongifolius* IN KANCHANABURI PROVINCE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SURACHAI PORNPAKAKUL, Ph.D., 144 pp. ISBN 974-17-3965-6

An endophytic fungus KBLM13, isolated from *Croton oblogifolius* in Kanchanaburi Province was produced antimicrobial compounds. Morphology of this fungi indicated that it was in genus xylaria. The endophyte KBLM13 was fermented on Sabouraud's Dextrose Broth (SDB) and followed by extraction and isolation antimicrobial compounds using chromatographic techniques and crystallization. Three compounds were obtained including two new natural products, (*S*)-(+) mellein methyl ether and Cyclo[Gly-(*S*)-Pro] from ethyl acetate extract of mycelia and culture broth, respectively and Cyclo-(L)-Pro-(L)-Val from ethyl acetate of culture. Antimicrobial activity of three compounds was determined by The Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC). The results showed (*S*)-(+) mellein methyl ether exhibited against *B. subtilis* ATCC 6633 and *S. aureus* ATCC 25923 with MIC value of 62.5 (325.18) µg/ml (µM), Cyclo-(L)-Pro-(L)-Val showed against *B. subtilis* ATCC 6633 with MIC value of 7.82 (39.86) µg/ml (µM) and Cyclo[Gly-(*S*)-Pro] showed against *B. subtilis* ATCC 6633 and *S. aureus* with MIC value of 125 (811.16) µg/ml (µM).

Field of study.....Biotechnology..... Student's signature...Bhuminan Tadtheam.....

Academic year.....2005..... Advisor's signature...Surachai Pornpakakul.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย พรภคกุล อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนได้ศึกษาอยู่

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เริงสำราญ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทห์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำแก่ผู้เขียน

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ อาจารย์ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และที่หน่วยวิจัยไบโอออร์แกนิกเคมี (Research Centre for Bioorganic Chemistry, RCBC) ทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ เป็นอย่างดีตลอดเวลาที่ได้ทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีแก่ผู้เขียนจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูป	ฎ
สารบัญแผนภาพ	ฐ
คำย่อ	ฑ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 คำจำกัดความของเอ็นโดไฟต์	3
2.2 การจัดกลุ่มเอ็นโดไฟต์ในทางนิเวศวิทยา	5
2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างราเอ็นโดไฟต์กับพืชในทางนิเวศวิทยา	6
2.4 ประโยชน์ที่พืชได้รับจากราเอ็นโดไฟต์	6
2.5 การศึกษาเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอ็นโดไฟต์	8
2.6 เปล้าใหญ่	34
2.7 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเปล้าใหญ่	34
2.8 สรรพคุณทางยา	35
2.9 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเปล้าใหญ่	36
2.10 การศึกษาเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอ็นโดไฟต์ที่แยกมาจากเปล้าใหญ่ในประเทศไทย	44
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	48
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	48
3.2 สารเคมี	49
3.3 เทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการทดลอง	50
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	51
3.5 ราเอ็นโดไฟต์ที่ใช้ในการทดลอง	51
3.6 การเก็บรักษาราเอ็นโดไฟต์	51
3.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์และการจัดจำแนกราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13	52

หน้า

3.8 การเตรียมเชื้อจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ..... 53
3.9 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 55
3.10 การหาอัตราการเจริญเติบโต (growth curve) และการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์KBLM13..... 56
3.11 การสกัดและการแยกสารประกอบของสารสกัดที่ได้จากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 57
3.12 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 59
3.13 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 61
3.14 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์..... 64
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 67
4.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์และการจัดจำแนกราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 67
4.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 74
4.3 อัตราการเจริญเติบโต (growth curve) และช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 76
4.4 การเลี้ยงเชื้อ การสกัด และการแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพจากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 80
4.5 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 82
4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์..... 97
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... 98
รายการอ้างอิง..... 100
ภาคผนวก..... 114
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 144

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอ็นโดไฟต์..... 16

2.2 องค์ประกอบทางเคมีของเปล้าใหญ่ *Croton oblongofolius*..... 37

2.3 สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอ็นโดไฟต์ที่แยกจากเปล้าใหญ่ในประเทศไทย..... 45

3.2 เชื้อจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ..... 54

3.3 จำนวนจุลชีพทดสอบ (CFU/ml) ที่มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard..... 54

3.4 การแยกสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตของเส้นใยราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 59

3.5 การแยกสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตของน้ำเลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 60

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ต่างกัน 5 ชนิด..... 67

4.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 75

4.3 ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของน้ำเลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 77

4.4 ฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM 13..... 81

4.5 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 1..... 82

4.6 แสดงค่า ^{1}H-NMR (δ_H), ^{13}C-NMR (δ_C), gHSQC, gHMBC และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 1..... 84

4.7 แสดงค่า ^{1}H-NMR (δ_H), ^{13}C-NMR (δ_C) ของสารบริสุทธิ์ 1 เทียบกับ Mellein 85

4.8 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 2..... 87

4.9 แสดงค่า ^{1}H-NMR (δ_H), ^{13}C-NMR (δ_C), gHSQC, gHMBC และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 2..... 89

ตารางที่ **หน้า**

4.10 แสดงค่า ^{1}H-NMR (δ_H), ^{13}C-NMR (δ_C) ของสารบริสุทธิ์ 2 เทียบกับ Cyclo(L)-Pro-(L)-Val..... 90

4.11 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 3..... 92

4.12 แสดงค่า ^{1}H-NMR (δ_H), ^{13}C-NMR (δ_C), gHSQC, gHMBC และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 3..... 94

4.13 แสดงค่า ^{1}H-NMR (δ_H), ^{13}C-NMR (δ_C) ของสารบริสุทธิ์ 3 เทียบกับ Cyclo[Gly-(*S*)-Pro] 95

4.13 ค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ..... 97

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ความสัมพันธ์ระหว่างราเอ็นโดไฟต์กับพืช	7
2.2	วงจรชีวิตของราเอ็นโดไฟต์ในต้นหญ้า	7
2.3	Taxol	8
2.4	Cryptocandin	9
2.5	Isopectin และ Pectin	10
2.6	Cytonic acid A และ B	10
2.7	Subglutinol A	11
2.8	Sequoiatones A และ B	12
2.9	Leucinostatin A	12
2.10	Torreyanic acid	13
2.11	Fusaricide	13
2.12	สารในกลุ่มของ Ergot alkaloid	14
2.13	ลักษณะของเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius*	35
2.14	โครงสร้างพื้นฐานขององค์ประกอบทางเคมีของสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์ในเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius*	43
2.15	โครงสร้างทางเคมีสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอ็นโดไฟต์ที่แยกจากเปล้าใหญ่ในประเทศไทย	46
3.1	การทำ Slide Culture	53
4.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ต่างกัน 5 ชนิด	68
4.2	ลักษณะของเส้นใยราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13	70
4.3	ลักษณะสโตรมาของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)	70
4.4	การสร้างสโตรมาของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบนกิ่งไม้ในขวดทรงสูง	71

รูปที่ **หน้า**

4.5 ตัวอย่างราเอ็นโดไฟต์ในตระกูล Xylariaceae 73

4.6 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 76

4.7 วงใส (Inhibition Zone), แสดงช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของน้ำเลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13..... 78

4.8 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 1..... 86

4.9 โครงสร้างทางเคมีของ Mellein..... 86

4.10 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 2..... 91

4.14 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 3..... 96

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่		หน้า
3.1	แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากเส้นใยและน้ำลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13.....	58

คำย่อ

$[\alpha]_D^{25}$	=	Specific rotation at 20 °C and Sodium D line (589 nm)
ATCC	=	American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A
brs	=	broad singlet (for NMR spectral data)
brt	=	broad triplet (for NMR spectral data)
°C	=	degree Celsius
^{13}C-NMR	=	carbon-13 nuclear magnetic resonance
$CDCl_3$	=	deuterated chloroform
CD_3OD	=	deuterated methanol-d_4
$CHCl_3$	=	chloroform
CH_2Cl_2	=	dichloromethane
cm	=	centimeter
gCOSY	=	Gradient ^{1}H-^{1}H correlation spectroscopy
CFU	=	Colony forming unit
δ	=	chemical shift
d	=	doublet (for NMR spectral data)
dd	=	doublet of doublet (for NMR spectral data)
dsep	=	doublet of septet (for NMR spectral data)
dt	=	doublet of triplets (for NMR spectral data)
ε	=	molar absorptivity
EIMS	=	electron impact mass spectroscopy
eq	=	equatorial
EtOAc	=	ethyl acetate
g	=	gram
gHMBC	=	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation
gHSQC	=	Gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence
^{1}H-NMR	=	Proton Nuclear Magnetic Resonance
Hz	=	hertz
IR	=	infrared spectroscopy

l	=	liter
µl	=	micro liter
λ_{max}	=	wavelength of maximum absorption
$[M+H]^+$	=	protonated molecular ion
m	=	multiple (for NMR spectral data)
MEA	=	Malt extract agar
MHB	=	Mueller-Hinton Broth
MeOH	=	methanol
MIC	=	Minimum inhibitory concentration
mg	=	milligram
µg	=	microgram
MHz	=	megahertz
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
ν_{max}	=	wave number at maximum absorption
NMR	=	nuclear magnetic resonance
No.	=	Number
ppm	=	part per million
PDA	=	Potato Dextrose Agar
q	=	quartet (for NMR spectral data)
s	=	singlet (for NMR spectral data)
SDA	=	Sabouraud's Dextrose Agar
SEM	=	scanning electron microscope
t	=	triplet (for NMR spectral data)
TLC	=	thin layer chromatography
UV	=	Ultraviolet
YES	=	Yeast Extract Agar