รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

Metabolites จากเชื้อราที่แยกได้จากกัลปังหาและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

Metabolites of Fungi Isolated from Sea Fan and Their Antimicrobial Activity

โดย

รศ.ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร
ศ.ดร.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล
นายศักดิ์อนันต์ ปลาทอง
ดร.จริยา สากยโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีงบประมาณ 2550-2551

บทคัดย่อ

เชื้อราเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อราจากกัลปังหาจากหมู่เกาะสิมิลัน จังหวัดพังงา และจากทะเลในจังหวัดสุราษฎร์ธานี แล้วนำมาทดสอบศักยภาพในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ แยกได้เชื้อราทั้งหมด 163 isolates นำเชื้อราไปเลี้ยงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) และทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธี agar-well diffusion จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อราไปสกัดด้วย ethyl acetate ส่วนเส้นใยเชื้อราบางชนิดสกัดด้วย hexane และ ethyl acetate แล้วทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี microdilution ต่อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, methicillin-resistant *S. aureus* ที่แยกได้จากโรงพยาบาล, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และเชื้อรา *Microsporum gypseum* ที่แยกได้จากโรงพยาบาล, *Candida albicans* ATCC 90028 และ *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 พบว่าจากสารสกัดทั้งหมด 337 สาร มีสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จำนวน 108 สาร (32.05%) จากเชื้อรา 77 isolates (47.24%) โดยมีสารสกัด 9.50-13.06% ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ MRSA (MIC 4-1,280 µg/ml) สารสกัด 13.06% ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* (MIC10-1,280 µg/ml) และ 9.20% ยับยั้งเชื้อ *E. coli* (MIC 40-1,280 µg/ml) สำหรับฤทธิ์ต้านราพบสารสกัด 11.97% ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *M. gypseum* (MIC 1-1,280 µg/ml) และมีสารสกัดเพียง 2.08-2.37% ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. neoformans* (MIC= 10-640 µg/ml) และ *C. albicans* (MIC= 80-640 µg/ml) ตามลำดับ เชื้อราที่สร้างสารต้านเชื้อ *S. aureus* และ *C. neoformans* ดีที่สุด คือ F37 ส่วนเชื้อราที่สร้างสารต้านเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *M. gypseum* ดีที่สุด คือ F77, F151 และ F13 ตามลำดับ เชื้อราที่สร้างสารต้านเชื้อ *C. albicans* ดีที่สุดคือ F78 และ F135 จากฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และ NMR profile ที่นักเคมีสนใจ สามารถคัดเลือกเชื้อราได้ทั้งหมด 24 isolates โดยจากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาสามารถจัดจำแนกเชื้อรา F13 (*Nigrospora* sp.) และ F37 (*Penicillium* sp.) ได้ และจากการจัดจำแนกชนิดด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม โดยวิเคราะห์ยีน rRNA ในส่วน internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2, ITS) พบว่าราจากกัลปังหามีความหลากหลาย โดยกระจายอยู่ใน 6 Orders ได้แก่ Capnodiales, Eurotiales, Trichosphaeriales Hypocreales, Pleosporales, Xylariales และ anamorphic Ascomycota อีก 1 กลุ่ม ส่วนเชื้อรา F77 (*Scolecobasidium* sp.) แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* ดีที่สุด รา F78 (*Aspergillus aculeatus*) และ F135 (*Nectria* sp.) สร้างสารต้านเชื้อ *C. albicans* ดีที่สุด และ F151 (*Annulohypoxylon nitens*) แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ดี

ที่สุด จากนั้นได้คัดเลือกเชื้อรา F13 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านราดีที่สุดไปเพาะเลี้ยงเชื้อในปริมาณมากเพื่อการแยกสาร สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 13 สาร เป็นสารใหม่ 2 สารซึ่งจัดเป็นอนุพันธ์ของ dechlorogriseofulvin และ chlorogriseofulvin สารที่เคยมีการรายงานโครงสร้างแล้ว 11 สาร ได้แก่ griseofulvin, dechlorogriseofulvin, (*R*)-mellin, *cis*-4-hydroxymellin, 6β-hydroxy-8-dihydroramulosin, 8-dihydroramulosin, 6-hydroxyramulosin, 9α-hydroxydihydrodesoxy-bostrycin, 9-epimer of halorosellinia A, norlichexanthone และ alternariol โดยมีสาร griseofulvin และ dechlorogriseofulvin ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *M. gypseum* ด้วยค่า MIC 2 และ 32 μg/ml ตามลำดับ ส่วนสารที่เหลือไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรานี้ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่แยกได้จากกัลปังหาเป็นแหล่งของสารใหม่และสารต้านจุลินทรีย์ที่ดี

Abstract

Fungi are good sources of bioactive compounds. In this study 163 different fungi were isolated from gorgonian sea fans obtained from the Similan islands, Phanga and coastal area in Suratthani, southern Thailand. Culture broths of all isolates were screened for their antimicrobial activities against pathogenic microorganisms by agar-well diffusion method. Crude ethyl acetate extracts of the culture broth and crude hexane and ethyl acetate extracts of the fungal mycelium were then tested for their minimum inhibitory concentrations (MICs) by agar and broth microdilution. The microbial pathogens tested were bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a clinical isolate of methicillin-resistant *S. aureus*, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and fungi: *Microsporum gypseum* clinical isolate, *Candida albicans* ATCC 90028 and *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112. One hundred and eight out of 337 (32.05%) extracts from 77 fungal isolates (47.24%) exhibited antimicrobial activity against at least one pathogen. 9.50 to 13.06%, 9.20% and 13.06% of the crude extracts inhibited both strains of *S. aureus* (MICs 4 to 1,280 µg/ml), *E. coli* (MICs 40 to 1,280 µg/ml) and *P. aeruginosa* (MICs 10 to 1,280 µg/ml), respectively. 11.97% of the extracts displayed antifungal activity against *M. gypseum* (MICs 1 to 1,280 µg/ml), while only 2.08 to 2.37% of the extracts inhibited *C. neoformans* (MICs 10 to 640 µg/ml) and *C. albicans* (MICs 80 to 640 µg/ml). Isolate F37 displayed the strongest activity against both strains of *S. aureus* and *C. neoformans*. Isolates F77, F151, and F13 displayed the strongest activity against *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *M. gypseum*, respectively while F78 and F135 inhibited *C. albicans*. Twenty-four isolates were selected from antimicrobial activity and produced interesting secondary metabolites. Based on their morphology, F13 and F37 were identified as *Nigrospora* sp. and *Penicillium* sp., respectively. Fungal identification based on the ribosomal RNA-Internal Transcribed Spacers (ITS1-5.8S-ITS2, ITS) analysis revealed that 24 of the selected isolates belonged to six orders; Capnodiales, Eurotiales, Trichosphaeriales, Hypocreales, Pleosporales, Xylariales and one anamorphic Ascomycota. Isolate F77 (*Scolecobasidium* sp.) had the strongest activity against *E. coli* ATCC 25922. Isolate F78 (*Aspergillus aculeatus*) and F135 (*Nectria* sp.) displayed the strongest antifungal

activity against *C. albicans* ATCC 90028. Isolate F151 (*Annulohypoxylon nitens*) showed the strongest activity against *P. aeruginosa* ATCC 27853. Isolate F13 having the strongest antifungal activity was selected for large scale fermentation and extraction. Thirteen pure compounds were isolated including two new compounds which were the derivatives of dechlorogriseofulvin and chlorogriseofulvin. Eleven known compounds consisted of griseofulvin, dechlorogriseofulvin, (*R*)-mellin, *cis*-4-hydroxymellin, 6β-hydroxy-8-dihydroramulosin, 8-dihydroramulosin, 6-hydroxyramulosin, 9α-hydroxy dihydrodesoxybostrycin, 9-epimer of halorosellinia A, norlichexanthone and alternariol Griseofulvin and dechlorogriseofulvin had antifungal activity against *M. gypseum* with MIC values of 2 and 32 μg/ml, respectively. Other compounds had no antifungal activity. The results indicated that fungi isolated from sea fans are a potential source of new compounds and antimicrobial agents.