Abstract

Project Code : RMU54_005

Project Title : Isolation of Antimicrobial compounds from endophytic actinomycetes in Medicinal plants

Investigator : Asst. Prof. Dr. Thongchai Taechowisan, Silpakorn University

E-mail Address : tewson84@hotmail.com, tthongch@su.ac.th

Project Period : June 15, 2011 - June 14, 2014

The isolation of endophytic actinomycetes from surface-sterilized tissues of 11 plant species was made using humic acid-vitamin (HV) agar as a selection medium. Of the 530 isolates recovered, 299 were from roots, 118 from stems and 113 from leaves with a prevalence of 3.02, 1.19 and 1.14%, respectively. Twenty isolates strong inhibited tested microorganisms and were classified as *Streptomyces* sp. based on their morphology and the amino acid composition of the whole-cell extract. Thirteen isolates were selected and cultured for secondary metabolite extraction.

Strain LJK109 was isolated from the root tissues of *Alpinia galangal* (L.) Willd. It was an antagonist of phytopathogenic fungi; *Alternaria porri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae*, *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Exserohilum* sp., *Fusarium oxysporum*, *Verticillium* sp. and *Sclerotium rolfsii*. The major active ingredients from the crude extract were purified by silica gel column chromatography, thin-layer chromatography and identified to be 3-methylcarbazole and 1-methoxy-3-methylcarbazole by NMR and mass spectral data, respectively. Bioassay studies showed that these compounds had antifungal activities against tested fungi, and its minimum inhibitory concentrations were found to be within the range of 30 to 240 μg/ml. Conidia germination was also inhibited by these compounds as determined by microscopy.

The immunomodulatory activity of 3-methylcarbazole and 1-methoxy-3-methylcarbazole in toll like receptor (TLR)-activated RAW 264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide (LPS), Poly (I:C), and pam3CSK was investigated by assessing nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines. These 3-methylcarbazoles dose-dependently suppressed the release of NO, PGE_2, TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-10 in LPS- and pam3CSK-activated macrophages but not in Poly (I:C)-activated macrophages. Our results

suggest that 3-methylcarbazoles can be further developed as a promising anti-inflammatory remedy.

Strain BRM10 was isolated from the root tissues of *Alpinia galanga* Swartz. It was an antagonist of some bacteria, *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC10536 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. The major active ingredients from the crude extract were purified by silica gel column chromatography, thin-layer chromatography and identified to be 1-methyl ester-nigericin and nigericin by NMR and mass spectral data, respectively. Bioassay studies showed that 1-methyl ester-nigericin had antibacterial activity against Gram positive bacteria lower than nigericin, and its minimum inhibitory concentrations against *S. aureus* and *B. cereus* were 0.5 μg/ml and 1.0 μg/ml, respectively and no inhibitory activity was observed against *E. coli* and *P. aeruginosa*, at a concentration of 64 μg/ml.

Strain GMT-8 was isolated from the root tissue of *Zingiber officinale* Rosc. It was an antagonist of Gram positive bacteria; *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC7064 and *Bacillus subtilis* ATCC6633. The major active ingredient from the crude extract was purified by silica gel column chromatography, thin-layer chromatography and identified to be decursin by NMR and mass spectral data, respectively. Bioassay studies showed that decursin had antibacterial activities against Gram positive bacteria with the minimum inhibitory concentrations within the range of 32 to 256 μg/ml.

Strain BT01 was isolated from the root tissue of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. It was an antagonist of Gram positive bacteria; *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC7064 and *Bacillus subtilis* ATCC6633. The major active ingredients from the crude extract were purified by silica gel column chromatography, thin-layer chromatography and identified to be two new flavonoids, 7-methoxy-3, 3',4',6-tetrahydroxyflavone and 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone, together with four known compounds, fisetin, naringenin, 3'-hydroxydaidzein and xenognosin B. Bioassay studies showed that these compounds had antibacterial activity with the minimum inhibitory concentrations within the range of 32 to 256 μg/ml.

The new flavonoids, 7-methoxy-3,3’,4’,6-tetrahydroxyflavone and 2’,7-dihydroxy-4’5’-dimethoxyisoflavone isolated from *Streptomyces* sp. BT01 inhibited the pro-inflammatory mediators including cytokines by blocking nuclear factor-kappa B (NF-ĸB) signalling in

lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. These flavonoids suppressed mRNA and protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. These results suggest that these flavonoids have anti-inflammatory effects.

Strain HK17 was isolated from the root tissue of *Curcuma longa* Linn. The major active ingredients from the crude extract of this strain were purified by silica gel column chromatography, thin-layer chromatography. Extraction of the culture medium of this strain was purified and identified as flavonoids; 2(*S*)-5,7-dihydroxy-8,2'-dimethoxyflavanone, 2(*S*)-5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavanone, 2(*S*)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxy flavanone and 2(*S*)-7,2'-Dihydroxy-5,8-dimethoxyflavanone which displayed strong antibacterial and anticandidal properties. The crude extract showed the highest activity against *S. aureus* and *C. albicans*, with MIC values of 32 μg/ml. The purified 2(*S*)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxy flavanone showed the lowest MIC (32 μg/ml) and MMC (128 μg/ml) against *S. aureus* and *C. albicans* with corresponding large diameter of the zone of inhibitions (25.5 and 25.2 mm respectively). This study has shown that the new flavonoids which were isolated from *Streptomyces* sp. HK17 have potential in antibacterial and anticandidal activities.

Keywords : Antimicrobial compounds, Anti-inflammatory activity, Endophytic actinomycetes, *Streptomyces* sp.

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RMU54_005

ชื่อโครงการ : การแยกสารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อแอคติโนมัยซีสในพืชสมุนไพร

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.ธงชัย เตโชวิศาล

E-mail Address : tewson84@hotmail.com, tthongch@su.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 15 มิถุนายน 2554 - 14 มิถุนายน 2557

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากเนื้อเยื่อพืช 11 สปีชีส์ ด้วยการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวแล้วบ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ humic acid-vitamin (HV) agar สามารถแยกเชื้อได้ 530 สายพันธุ์ ซึ่งแบ่งเป็นแยกจากราก 299 สายพันธุ์ แยกจากลำต้น 118 สายพันธุ์ และแยกจากใบ 113 สายพันธุ์ คิดเป็นความชุก 3.02, 1.19 และ 1.14%, ตามลำดับ พบว่า 20 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ และถูกจำแนกเป็น *Streptomyces* sp. โดยสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบของกรดอะมิโนจากสารสกัดเซลล์ ได้คัดเลือกเชื้อ 13 สายพันธุ์มาเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดสารเมแทบอลิสมทุติยภูมิ

สายพันธุ์ LJK109 แยกได้จากรากข่า (*Alpinia galanga* (L.) Willd) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชหลายชนิด เช่น *Alternaria porri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae*, *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Exserohilum* sp., *Fusarium oxysporum*, *Verticillium* sp. และ *Sclerotium rolfsii* จากการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบโดยวิธี silica gel column chromatography และ thin-layer chromatography พบว่าเป็นสาร 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบต่าง ๆ โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) 30-240 μg/ml และสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย

คุณสมบัติปรับภูมิคุ้มกันของสาร 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole โดยผ่านทาง toll like receptor (TLR) ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS), Poly (I:C), และ pam3CSK โดยการวัด nitric oxide (NO) และไซโตไคน์หลายชนิด พบว่าสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการหลั่ง NO, PGE_2, TNF-α, IL-1β, IL-6 และ IL-10 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ pam3CSK ขณะที่การกระตุ้นด้วย Poly (I:C) ไม่สามารถยับยั้ง ดังนั้นสาร 3-methylcarbazoles จึงน่าจะสามารถพัฒนาเป็นสารยับยั้งการอักเสบได้ในอนาคต

สายพันธุ์ BRM10 แยกจากรากข่า (*Alpinia galanga* Swartz) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบหลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC10536 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 จากการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบโดยวิธี silica gel column chromatography

และ thin-layer chromatography พบว่าเป็นสาร 1-methyl ester-nigericin และ nigericin ซึ่งพบว่า 1-methyl ester-nigericin มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ต่ำกว่า nigericin และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) ต่อ *S. aureus* และ *B. cereus* เป็น 0.5 และ 1.0 μg/ml ตามลำดับ และพบว่าไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่ระดับความเข้มข้น 64 μg/ml

สายพันธุ์ GMT-8 แยกจากรากขิง (*Zingiber officinale* Rosc) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC7064 และ *Bacillus subtilis* ATCC6633 จากการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบโดยวิธี silica gel column chromatography และ thin-layer chromatography พบว่าเป็นสาร decursin ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) ในช่วง 32-256 μg/ml

สายพันธุ์ BT01 แยกจากรากกระชาย (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC7064 และ *Bacillus subtilis* ATCC6633 จากการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบโดยวิธี silica gel column chromatography และ thin-layer chromatography พบว่าเป็นสารฟลาโวนอยด์ชนิดใหม่ 2 สาร คือ 7-methoxy-3, 3',4',6-tetrahydroxyflavone และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone และเป็นสารฟลาโวนอยด์ที่รู้จักแล้ว 4 สาร คือ fisetin, naringenin, 3'-hydroxydaidzein และ xenognosin B พบว่าเป็นสารเหล่านี้มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) ในช่วง 32-256 μg/ml

สารฟลาโวนอยด์ชนิดใหม่ 2 สาร คือ 7-methoxy-3, 3',4',6-tetrahydroxyflavone และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone ที่แยกได้จาก *Streptomyces* sp. BT01 สามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยมีกลไกการยับยั้งการกระตุ้น nuclear factor-kappa B (NF-ΚB) ซึ่งพบว่าสารฟลาโวนอยด์นี้ยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA และโปรตีนของ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) สารฟลาโวนอยด์นี้จึงมีคุณสมบัติต้านการอักเสบได้

สายพันธุ์ HK17 แยกจากรากขมิ้น (*Curcuma longa* Linn) จากการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบโดยวิธี silica gel column chromatography และ thin-layer chromatography พบว่าเป็นสารฟลาโวนอยด์ชนิดใหม่ 4 สาร คือ 2(*S*)-5,7-dihydroxy-8,2'-dimethoxyflavanone, 2(*S*)-5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavanone, 2(*S*)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxy flavanone และ 2(*S*)-7,2'-Dihydroxy-5,8-dimethoxyflavanone ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ พบว่าสารสกัดหยาบยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *C. albicans*

ที่ระดับค่า MIC 32 μg/ml และพบว่าสาร 2(*S*)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxy flavanone ให้ค่า MIC (32 μg/ml) และ MMC (128 μg/ml) ต่อ *S. aureus* และ *C. albicans* ซึ่งสอดคล้องกับค่าแนวการยับยั้งการเจริญ (25.5 และ 25.2 mm ตามลำดับ) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารฟลาโวนอยด์ชนิดใหม่จาก *Streptomyces* sp. HK17 มีคุณสมบัติต้านการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ได้

คำหลัก : สารต้านจุลินทรีย์, คุณสมบัติต้านการอักเสบ, แอคติโนมัยซีสในพืช, สเตร็ปโตมัยซีส