ง

170708

สินทวี สิงห์วงศ์วัฒนะ: สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากกระท่อม *Mitragyna speciosa* Korth. (BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM *Mitragyna speciosa* Korth.) อาจารย์ที่ปรึกษา: ศ. ดร. โสภณ เริงสำราญ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ 113 หน้า, ISBN 974-53-1887-6

การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบกระท่อม *Mitragyna speciosa* Korth. โดยนำใบกระท่อมจากจังหวัดปทุมธานี, อยุธยา และสุราษฎร์ธานี มาคัดแยกราโดยผ่านวิธีฆ่าเชื้อที่ผิวนอกและวางบน potato dextrose agar สามารถแยกราได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลต ทำการทดสอบฤทธิ์ของราเอนโดไฟต์ด้วยวิธี dual-culture agar diffusion พบว่าราเอนโดไฟต์ ไอโซเลต P03 สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด เมื่อนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของ rDNA พบว่าราเอนโดไฟต์ P03 คือ *Glomerella cingulata* จากนั้นทำการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยนำราเอนโดไฟต์ P03 มาเลี้ยงในอาหารเหลว sabouraud dextrose ทำการแยกสารบริสุทธิ์จากน้ำหมักและเส้นใยของราด้วยวิธีโครมาโทกราฟีและการตกผลึก และหาสูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวโดยอาศัยสมบัติทางกายภาพและเทคนิคทางสเปกโทสโกปี พบว่า เมื่อแยกส่วนสกัดเอทิลแอซิเตตจากเส้นใยได้ของผสม 1 ชนิดคือ น้ำมัน (ของผสม 1) และสารบริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ ergosterol peroxide (สารบริสุทธิ์ 1) เมื่อแยกส่วนสกัดเมทานอลจากเส้นใย ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ ursolic acid (สารบริสุทธิ์ 2) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งคน 5 ชนิด พบว่าสารบริสุทธิ์ 1 มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albican* ATCC 10231 ด้วยค่า MIC เท่ากับ 15.6 (36.4), 15.6 (36.4), 15.6 (36.4), 15.6 (36.4) และ 61.25 (143.1) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครโมลาร์) ตามลำดับ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2),เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474)โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.0 (11.7), 6.3 (14.7), 5.2 (12.1), 5.8 (13.6) และ 8.5 (19.2) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครโมลาร์) ตามลำดับ สำหรับสารบริสุทธิ์ 2 มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC และ *Candida albican* ATCC 10231 27853 ด้วยค่า MIC เท่ากับ 125 (274.1), 125 (274.1), 250 (548.2), 125 (274.1) และ 125 (274.1) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครโมลาร์) ตามลำดับ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2),เซลล์มะเร็งปอด(CHAGO),เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620),เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3)และ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.4 (11.8), 5.6 (12.3), 0.8 (1.7), 0.5 (1.1) และ 0.7 (1.5) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครโมลาร์) ตามลำดับ

สาขาวิชา....เทคโนโลยีชีวภาพ.... ลายมือชื่อนิสิต......สินทวี......สิงห์วงศ์วัฒนะ..........

ปีการศึกษา.......2547............... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.......................................

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.......................................

4572531323: MAJOR BIOTECHNOLOGY 170708

KEY WORD: ENDOPHYTIC FUNGI / *Mitragyna speciosa* Korth. / ANTIMICROBIAL ACTIVITY/ ERGOSTEROL PEROXIDE / URSOLIC ACID

SINTAWEE SINGWONGWATANA: BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM *Mitragyna speciosa* Korth. THESIS ADVISOR: PROF. SOPHON ROENGSUMRAN, THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PRAKITSIN SIHANONTH 113 pp. ISBN 974-53-1887-6

The purpose of this research was to isolate bioactive compounds from endophytic fungi isolated from *Mitragyna speciosa* Korth. Plant samples were collected from 3 provinces; Pathumthani, Ayuthaya and Surathani. Fungal endophytes were isolated from leaves by surface sterilization and placed on potato dextrose agar. Thirty-nine fungal isolates were obtained and tested for the production of antimicrobial compounds by dual culture agar diffusion technique. Fungal isolate P03 was chosen for the study of bioactive compounds because this isolate produced the compounds that were against a large number of test microorganisms. Based on morphology and nucleotide sequencing of internal transcribed spacer (ITS) regions of rDNA, isolate P03 was identified as *Glomerella cingulata*. Chromatographic techniques and crystallization were used to isolate bioactive compounds from sabouraud dextrose broth ethyl acetate crude, mycelium ethyl acetate crude and mycelium methanol crude. Structure elucidations of the pure compounds were investigated using physical properties and spectroscopic techniques. Mycelium ethyl acetate crude gave oil (mixture 1) and ergosterol peroxide (compound 1). Mycelium methanol crude gave ursolic acid (compound 2). Antimicrobial activities and cytotoxicity of the pure compound were tested. Ergosterol peroxide (compound 1) was found to exhibit activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Candida albican* ATCC 10231 with the MIC value of 15.6 (36.4), 15.6 (36.4), 15.6 (36.4), 15.6 (36.4) and 61.25 (143.1) μg/ml (μM), respectively; and exhibit cytotoxic activity against HEP-G2, CHAGO, SW620, KATO-3 and BT474 with IC_{50} 5.0 (11.7), 6.3 (14.7), 5.2 (12.1), 5.8 (13.6) and 8.5 (19.2) μg/ml (μM), respectively. Ursolic acid (compound 2) was found to exhibit activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Candida albican* ATCC with the MIC value of 125 (274.1), 125 (274.1), 250 (548.2), 125 (274.1) and 125 (274.1) μg/ml (μM), respectively; and exhibit cytotoxic activity against HEP-G2, CHAGO, SW620, KATO-3 and BT474 with IC_{50} 5.4 (11.8), 5.6 (12.3), 0.8 (1.7), 0.5 (1.1) and 0.7 (1.5) μg/ml (μM), respectively.

Field of study....Biotechnology........... Student signature....................................

Academic year....2004..................... Advisor's signature....................................

Co-advisor's signature....................................