

|                       |                                                                                                                       |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Thesis Title</b>   | Inhibitory Activity of <i>Bacillus subtilis</i> Against Growth of Aflatoxigenic Fungi Isolated from Bird Chili Powder |
| <b>Author</b>         | Miss Rattanaorn Thakaew                                                                                               |
| <b>Degree</b>         | Master of Science (Biotechnology)                                                                                     |
| <b>Thesis Advisor</b> | Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup                                                                                  |

### ABSTRACT

The bird chili powder (*Capsicum frutescence* Linn.) was a source of aflatoxigenic fungus which was molecularly identified as *Aspergillus flavus*. Its 18S rRNA gene sequence was highly related to *A. flavus* ATTC 11489, *A. flavus* ATTC 9643 and *A. flavus* ATTC 11497. The amount of aflatoxin B<sub>1</sub> in each chili powder sample was correlated with the frequency of occurrence of *A. flavus* isolated from that chili sample. Moreover, the amount of aflatoxin B<sub>1</sub> in the culture medium of *A. flavus* was shown to be 27.6 µg/L.

The antagonist *Bacillus subtilis* BCC 6327 was demonstrated to inhibit the growth of aflatoxigenic *A. flavus* by dual culture both in broth medium and agar plate. Furthermore, the extracellular metabolites in cell free supernatant of *B. subtilis* BCC 6327 was possessed a strong inhibitory to affect against the growth and spore germination of the isolated aflatoxigenic fungi. The antifungal effect of the stationary growth phase was higher than that of the exponential phase. Moreover, the antifungal

potential of cell free supernatant of *B. subtilis* was probably related to the increased production of hydrolytic enzymes, particularly protease and chitinase. Productions of protease, chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase and the released sugars (total reducing sugar, glucose and N-acetylglucosamine) were enhanced by the addition of dried fungal mycelia. *B. subtilis* culture supernatant, containing protease and chitinase, were capable of hydrolyzing dried mycelia of the isolated *A. flavus*. The cell free supernatant of *B. subtilis* affected to decrease the growth of aflatoxigenic fungi when supplemented onto dried bird chili powder. The production of protease and chitinase enzymes by *B. subtilis* was related to fungal growth inhibition and the biological control of fungal pathogens, possibly due to the ability of *B. subtilis* to degrade fungal cell walls. *A. flavus* occurs widely during intermediate moisture food storage. Because of their activity against *A. flavus*, the extracellular metabolites of *B. subtilis* may be useful as potential biocontrol agents against *A. flavus* during food storage.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

กิจกรรมการยับยั้งของ *Bacillus subtilis* ต่อการเจริญของฟังไจที่ก่ออะฟลาทอกซินซึ่งแยกจากพริกชี้หนูปั่น

ผู้เขียน

นางสาว รัตนาภรณ์ ถาแก้ว

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์

## บทคัดย่อ

เชื้อราที่ก่ออะฟลาทอกซินที่แยกจากพริกชี้หนูปั่น (*Capsicum frutescens* Linn.) เมื่อวิเคราะห์ลำดับยีน 18s rRNA พบว่ามีลำดับยีนใกล้เคียงกับของเชื้อรา 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus flavus* ATTC 11489, *A. flavus* ATTC 9643 และ *A. flavus* ATTC 11497 ปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างพริกชี้หนูปั่นสัมพันธ์กับความถี่ในการตรวจพบเชื้อรา *A. flavus* ที่แยกได้จากตัวอย่างพริกปั่น โดยมีปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ในน้ำเลี้ยงเชื้อ *A. flavus* เท่ากับ 27.6 µg/L

สำหรับการใช้ *Bacillus subtilis* BCC 6327 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่า *A. flavus* ที่ก่ออะฟลาทอกซินถูกยับยั้งการเจริญ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ *B. subtilis* BCC 6327 ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง นอกจากนี้เมื่อของเหลวใสของน้ำเลี้ยง ซึ่งได้จากการนำเซลล์ของ *B. subtilis* BCC 6327 ออกไป พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการงอกของสปอร์ และพบว่าของเหลวใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียนี้ ในระยะคงที่ของการเจริญ (stationary phase) มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าของเหลวใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในระยะเพิ่มจำนวน (exponential phase) อีกทั้งประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราอาจจะสัมพันธ์กับปริมาณการผลิตเอนไซม์ของ *B. subtilis* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โปรติเอส และไคติเนส การผลิตเอนไซม์ โปรติเอส ไคติเนส และ เบต้า-1, 3-กลูคาเนส และน้ำตาลที่ปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยง (น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลกลูโคส และ N-acetyl glucosamine) เพิ่มขึ้นเมื่อใส่เส้นใยแห้งของเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเอนไซม์ โปรติเอส และไคติเนสจาก *B. subtilis* สามารถย่อยเซลล์เส้นใยแห้งของเชื้อรา *A. flavus* นอกจากนี้ของเหลวใสจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* สามารถลดการเจริญของเชื้อราที่ก่ออะฟลาทอกซินเมื่อใส่ลงไปในตัวตัวอย่างพริกชี้หนู

ป่น และการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และโคคิเนส จาก *B. subtilis* สัมพันธ์กับการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการควบคุมทางชีวภาพของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค โดยเฉพาะ *A. flavus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่พบได้มากในอาหารระหว่างการเก็บรักษาที่มีความชื้น ดังนั้นความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยสารเมตาโบไลต์จาก *B. subtilis* อาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารควบคุมการเจริญของเชื้อราด้วยวิธีการทางชีวภาพในอนาคตได้