

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380174

ชื่อโครงการ: การผลิตสารต้านเชื้อราจากยีสต์ *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนที่คัดแยกได้ในประเทศไทย

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สีนันท ประสงค์สุข ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมล: Sehanat.p@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 24 เดือน

บทคัดย่อ: จากการนำ *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนที่คัดแยกได้ในประเทศไทย จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ Deenarn 001 BCU, Deenarn 003 BCU, Deenarn 008 BCU, Deenarn 007 BCU, Deenarn 009 BCU, NRRL 58514, NRRL 58536, NRRL 58516, NRRL 58517 และ NRRL 58520 มาผลิตสารต้านเชื้อราและทำการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดที่ได้ในการต้านเชื้อราก่อโรคกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ (*A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus*) โดยวิธี Well diffusion และ Conidial germination inhibition assay พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 มีฤทธิ์สูงสุดในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergilli* ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาทำการเพิ่มผลผลิตของสารต้านเชื้อรา โดยทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส และ ซูโครส ที่ความเข้มข้น 1.5, 2.0 และ 2.5% (w/v) พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.5% (w/v) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ได้สูงสุดทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 75.00±0.00, 60.00 ±0.05, 60.00±0.00 และ 50.00±0.00 เปอร์เซ็นต์ ต่อ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ตามลำดับ จากนั้นนำ *A. pullulans* NRRL 58536 มาศึกษาผลของกรดอะมิโน พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในกรดอะมิโนภาวะที่มีฟีนิลอะลานีน ร่วมกับลิซีนมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. flavus* ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 175.00±0.05 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในกรดอะมิโนภาวะที่มีโปรลีนร่วมกับลิซีน พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. terreus* ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 120.00±0.01 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในกรดอะมิโนภาวะที่มีฟีนิลอะลานีนร่วมกับโปรลีน และ ลิซีน มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 146.00±0.08 และ 170.00±0.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อนำสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 มาตรวจสอบด้วยเทคนิคเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง เปรียบเทียบกับสารต้านเชื้อราออริโอบาซิดิน เอ (aureobasidin A) พบว่าสารที่ถูกแยกได้จากสารสกัดสายพันธุ์นี้มีค่า Rf เท่ากันกับออริโอบาซิดิน เอ มีค่า Rf เท่ากับ 0.68 บนแผ่น TLC และยังพบสารที่แตกต่างกันอีก 2 ตำแหน่ง มีค่า Rf เท่ากับ 0.45 และ 0.59 จากนั้นนำสารสกัดบริเวณที่มีค่า Rf เท่ากับออริโอบาซิดิน เอ มาวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางอีกครั้ง และทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography เทคนิค Spectrophotometry เทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry และเทคนิค ¹H-Nuclear Magnetic Resonance ผลการทดลองพบว่า *A. pullulans* NRRL 58536 ผลิตสารต้านเชื้อราที่มีผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับสารต้านเชื้อราออริโอบาซิดิน เอ

คำหลัก : *Aureobasidium pullulans*, สารต้านเชื้อรา, ออริโอบาซิดินเอ, *Aspergillus*

Abstract

Project Code : MRG5380174

Project Title : Production of antifungal agent from tropical yeast *Aureobasidium pullulans* isolated in Thailand

Investigator : Assistant Professor Dr. Sehanat Prasongsuk

E-mail Address : Sehanat.p@chula.ac.th

Project Period : 24 months

Abstract: Antifungal agent from 10 tropical strains isolated in Thailand of *Aureobasidium pullulans* including Deenarn 001 BCU, Deenarn 003 BCU, Deenarn 008 BCU, Deenarn 007 BCU, Deenarn 009 BCU, NRRL 58514, NRRL 58536, NRRL 58516, NRRL 58517 and NRRL 58520 was produced and the extracts were pretested for antifungal activity against 4 pathogenic *Aspergillus* spp. (*A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus*) using well diffusion method and conidial germination inhibition assay. The extract from *A. pullulans* NRRL 58536 showed the most efficient inhibitory activities against all 4 *Aspergilli*. This strain was selected to enhance antifungal agent production using carbon source optimization including glucose and sucrose at the concentrations of 1.5, 2.0 and 2.5% (w/v). The most effective extract was obtained from *A. pullulans* NRRL 58536 grown in 2.5% (w/v) of glucose by exhibiting inhibitory activities against all 4 *Aspergilli* with percent inhibition of 75.00 ± 0.00 , 60.00 ± 0.05 , 60.00 ± 0.00 and 50.00 ± 0.00 percent for *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* and *A. terreus*, respectively. *A. pullulans* NRRL 58536 was further subjected for studying the effect of amino acid on antifungal agent production. The highest antifungal activities against *A. flavus* was obtained from crude extract of *A. pullulans* NRRL 58536 under the condition of Phenylalanine plus Leucine with percent inhibition of 175.00 ± 0.05 percent while the condition of Proline plus Leucine gave the highest antifungal activities against *A. terreus* with percent inhibition of 120.00 ± 0.01 percent. The condition of Phenylalanine plus Proline and Leucine gave the highest antifungal activities against *A. niger* and *A. fumigatus* with percent inhibition of 146.00 ± 0.08 and 170.00 ± 0.06 percent respectively. The extract of *A. pullulans* NRRL 58536 was analyzed using Thin Layer Chromatography (TLC) with aureobasidin A (Ab A) as a comparative standard. The R_f values as 0.68 of *A. pullulans* NRRL 58536 crude extract was corresponded to that of Ab A observed on TLC plate and two spots of other compounds with different R_f values (0.45 and 0.59) were revealed. The extract containing similar R_f with that of Ab A was further analyzed using TLC, High Performance Liquid Chromatography, Spectrophotometry, MALDI-TOF Mass Spectrometry and ¹H-Nuclear Magnetic Resonance techniques. The results showed that *A. pullulans* NRRL 58536 produced the antifungal agent with characters corresponded to that of Ab A.

Keywords : *Aureobasidium pullulans*, Antifungal agent, aureobasidin A, *Aspergillus*