



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราทะเล

โดย นางธิดาพร บัวเจริญ และคณะ

มิถุนายน 2560

สัญญาเลขที่ RSA5780060

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราทะเล

คณะผู้วิจัย

นางธิดาพร บัวเจริญ	นักวิจัย/ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
นางสาวแสงอรุณ ย่อยพรมราช	ผู้ช่วยนักวิจัย/ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
นางสาวสุพิชชา โชคไพบลีย์	นิสิตปริญญาเอก/จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
นางสาวศนิษา ลาภานันท์	เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ/ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
นางพนิดา อุทะกุล	นักวิจัย/ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
นางสาวจริยา สากยโรจน์	นักวิจัย/ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
นางสาวสาทิณี ชื่อดตรง	นักวิจัย/ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
นายอนุพงศ์ คล้ายสุบรรณ	เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ/ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
นางสาวยุพิน บาลรัมย์	พนักงานห้องปฏิบัติการ/ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สวทช.

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สวทช. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) สำหรับการสนับสนุนด้านงบประมาณ

ขอขอบคุณ นักวิจัย ผู้ช่วยนักวิจัยและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ BIOTEC Culture Collection (BCC) และ Thailand Bioresource Research Center (TBRC) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และการให้บริการจุลินทรีย์

ขอขอบคุณ คุณสุริสา คงทอง และคุณสุทธิชัย นิธิธศิลป์ สำหรับการวิเคราะห์ทางด้าน NMR Spectroscopy และ Mass Spectrometry

ขอขอบคุณ ผู้บริหาร ฝ่ายประสานงาน ฝ่ายสนับสนุนการวิจัย และเจ้าหน้าที่ ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่บริหารโครงการ เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิชาการ และอื่น ๆ ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) สำหรับสถานที่ อุปกรณ์เครื่องมือ สิ่งอำนวยความสะดวก ที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย และขอขอบคุณ ผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่ร่วมกันดำเนินงานจนโครงการสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์

Project Code: RSA5780060

(รหัสโครงการ)

Project Title: Bioactive secondary metabolites from marine fungi

(ชื่อโครงการ)

Investigator: Taridaporn Buajarern

(ชื่อนักวิจัย)

Institute: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

(สถาบัน) (BIOTEC)

E-mail Address: taridaporn@biotec.or.th

Project Period: 3 years (16 June 2014–15 June 2017)

(ระยะเวลาโครงการ)

บทคัดย่อ

จากการรายงานที่ผ่านมามีรายงานว่าราทะเลมีศักยภาพในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ อีกทั้งยังมีโครงสร้างที่พิเศษและหลากหลาย งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ในการศึกษาศักยภาพการผลิตสารทุติยภูมิของราทะเลที่มีอยู่ใน Biotec Culture Collection (BCC) เพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งมีศักยภาพในการเป็น lead compounds สำหรับนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นยา หรือสารเคมีทางการเกษตร

สำหรับผลงานวิจัย ได้พบสารในกลุ่ม spirodioxynaphthalene ทั้งหมด 13 ตัว จากเชื้อราทะเล BCC 25093 (KH00100) ใน order Pleosporales ซึ่งแยกได้จากไม้โกงกางที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติหาดขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้ จ.สุราษฎร์ธานี โดยสาร 5 ตัวเป็นสารที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน (ใช้ชื่อว่า palmarumycins P₁-P₅) สาร palmarumycin P₁ และสารที่เคยมีการรายงาน คือ decaspiroones A และ C, และ palmarumycin CP₃ แสดงฤทธิ์ต้านมาลาเรียในระดับหลอดทดลองด้วยค่า IC₅₀ = 2.23-2.36 µg/mL และแสดงฤทธิ์ต้านวัณโรคในระดับหลอดทดลองด้วยค่า MIC = 1.56-3.13 µg/mL นอกจากนี้ยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ด้วยค่า IC₅₀ = 0.10-0.91 µg/mL

เชื้อราทะเล *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335 ซึ่งแยกได้จากต้นจาก (*Nypa fruticans*) จ.สมุทรปราการ พบสารที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน 3 ตัว คือ astronypyrone, astronyquinone และ astronyurea โดยสาร astronyquinone แสดงฤทธิ์อย่างอ่อนในการยับยั้งเชื้อก่อให้เกิดวัณโรคด้วยค่า MIC = 50 µg/mL ส่วนสารที่เคยมีการรายงานแล้ว คือ dimethoxy-O-methylpulvinone แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อให้เกิดโรคมมาลาเรียด้วยค่า IC₅₀ = 5.7 µg/mL

นอกจากนี้ยังพบสาร mycotoxin ในกลุ่ม trichothecene จากเชื้อราทะเล *Acremonium crotocinigenum* BCC 20012 ซึ่งแยกได้จากก้านใบของต้นจาก (*Nypa fruticans*) ที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะช้าง จ.ตราด จำนวน 7 ตัว โดยเป็นสารใหม่จำนวน 3 ตัว จากสารที่แยกได้และส่งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ สาร 7-dehydro-8-dehydroxytrichothecinol แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียด้วยค่า IC₅₀ = 3.28 µg/mL และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ด้วยค่า IC₅₀ = 11.37 µg/mL ส่วน crotocin ซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียได้ดีที่สุดด้วยค่า IC₅₀ = 0.05 µg/mL และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ด้วยค่า IC₅₀ = 0.13 µg/mL

พบสารในกลุ่ม eremophilane ทั้งหมด 13 ตัว ซึ่งเป็นสารใหม่ 9 ตัว จากเชื้อรา *Nemanima maritima* BCC 64093 ที่แยกได้จากซากกิ่งไม้หรือเศษไม้ ณ เกาะหวัด จ. ตราด สาร 11 ตัวในจำนวนนี้ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียและเชื้อแบคทีเรีย ณ ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดสอบ

จากงานวิจัยนี้พบว่าราทะเลที่เก็บและรวบรวมในประเทศไทย มีศักยภาพในการผลิตสารใหม่ ๆ ซึ่งโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ดังนั้นจึงเป็นแหล่งทรัพยากรที่มีความสำคัญเพื่อนำไปสู่การศึกษาการนำใช้ประโยชน์และการค้นพบสารที่มีศักยภาพในการพัฒนาต่อไป

คำสำคัญ: ราทะเล องค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ สารทุติยภูมิ เมตาบอไลต์

Abstract

Marine fungi have been convincing as a promising source of bioactive natural compounds with diverse and complex chemical structures. This research aims to explore the potential of Thai marine fungi as producers of novel and useful bioactive metabolites that might have potential as lead compound against infectious diseases or agricultural fungal diseases.

The fungal strain BCC 25093, isolated from an unidentified mangrove wood, was identified as a member of the order Pleosporales. This fungus was found to produce five new spirodioxynaphthalenes, palmarumycins P₁-P₅. Palmarumycin P₁ showed antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* K1 with an IC₅₀ value of 2.36 µg/ml, and exhibited antituberculosis activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra with a MIC value of 1.56 µg/ml. Cytotoxicity to Vero cells was observed for this compound with IC₅₀ = 0.79 µg/ml.

Study of the large scale fermentation of *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335, isolated from *Nypa fruticans*, led to the isolation and structure elucidation of three new compounds, astronypyrone, astronyquinone, and astronyurea, together with four known compounds. The known compound, dimethoxy-*O*-methylpulvinone, displayed antimalarial activity with IC₅₀ = 5.7 µg/ml. Astronyquinone showed weak antituberculosis activity with MIC = 50 µg/ml, and exhibited cytotoxic activity against Vero cell lines with IC₅₀ = 17.4 µg/ml.

Two new trichothecenes and a new chloroderivative of a trichothecene analogue together with four known trichothecenes were isolated from the fungus *Acremonium crotocinigenum* BCC 20012. A new trichothecene, 7-dehydro-8-dehydroxytrichothecinol B showed antimalarial activity with an IC₅₀ value of 3.28 µg/ml, and displayed cytotoxic activity against Vero cell lines with an IC₅₀ value of 11.37 µg/ml.

Chemical investigation of the fungus *Nemanja maritima* BCC 64093 led to the isolation and identification of 9 new and 4 known eremophilanes. Of these, 11 compounds were evaluated for biological activities, but they are all inactive against *Plasmodium falciparum* K1, *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecium*.

It has been demonstrated that Thai marine fungi are rich sources of novel natural products with interesting chemical structures and biological activities. Therefore, further study on utilization and discovery of potential bioactive compounds from this bioresource become indispensable.

Keyword: marine fungi, bioactive compound, secondary metabolite, spirodioxynaphthalene, Pleosporales, *Astrosphaeriella nypae*, antimalarial activity, antituberculosis activity

Executive Summary

1. Introduction to the research problem and its significance

Infectious disease such as malaria, tuberculosis, and other bacterial infections kill more than 2.5 million peoples a year. It increases clinical and therapeutic problems due to widespread and intensification of multi-drug resistance. Accordingly, the discovery of new chemical entities as lead or drug candidates to combat these infectious diseases is indispensable.

Rice and chilli are two major crops that are economically important to our country. The widespread of plant pathogenic fungi which cause rice blast, rice dirty panicle, and chili anthracnose diseases, can decrease seriously the quality and quantity of rice and chilli productions, resulting in an economic loss. Therefore, potential bioactive compounds which can be further developed as environment-friendly agrochemical, might be an alternative for Thai agriculture to fight against these plant pathogenic fungi diseases.

Convincing by chemical and pharmacological importance of marine fungal metabolites, our research project will be focused on this resource. In BIOTEC Culture Collection (BCC), 5,000 strains from at least 220 genera of marine fungi have been deposited and preserved. Of these fungal strains, many of them are rare species. Therefore with our unique, diverse, and valuable resource, we expect to find new bioactive metabolites, which might serve as lead compounds for further utilization in therapeutic and agricultural approaches. Moreover, this research will also add value to Thai marine fungi and bioresources.

2. Objectives

- To explore the potential of marine fungi as producers of new secondary metabolites with unique and diverse chemical structures.
- To find potential bioactive compounds, which might serve as lead compounds in drug discovery process or agrochemical development.
- To add up value for Thai marine fungi and biodiversity.

3. Methodology

3.1. Selection of candidate strains from the 1st screening

- Selection based on biological activity data

The crude extracts of marine fungi (approx. 10-20 strains/month) cultured in 6 different fermentation conditions (25 ml), will be evaluated for *in vitro* biological activities including anti-bacterial activity, and anti-fungal activity against plant disease pathogens (e.g. *Curvularia lunata*, *Colletotrichum capsici* and *Colletotrichum gloeosporioides*). The fungal strains, that give good results on biological activities, will be the candidates for large scale fermentation.

- Selection based on HPLC profile data

From the previous study, 67 strains of marine fungi selected based on diversity were fermented in 8 different culture media (25 ml) under static condition. Thereafter, 35 strains of these 76 strains were further evaluated in additional 7 modified media. The crude extracts were subjected to HPLC analyses. The fungal strains, that gave good HPLC profile (containing several interesting peaks and excluding compounds in our chemical library), will be the candidates for large scale fermentation.

3.2. Fermentation, Extraction, and Isolation

The selected strains will be cultured in liquid media (5-20 l), and then extracted with organic solvent. The crude extracts will be purified by chromatographic method (e.g. sephadex column chromatography, silica gel column chromatography, and HPLC) in order to obtain pure compounds. Structures of isolated pure compounds will be elucidated based on mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic data.

3.3. Evaluation of biological activities

Pure compounds will be evaluated for *in vitro* biological activities e.g. anti-malarial activity (against *Plasmodium falciparum*), anti-TB anti-malarial activity (against *Mycobacterium tuberculosis*), anti-bacterial activity (against both gram-negative and gram-positive strains), and anti-fungal activities (against *Colletotrichum capsici*, and *C. gloeosporioides* causing chilli anthracnose disease; against *Curvularia lunata* causing rice dirty panicle disease; and against *Alternaria brassicicola* causing black spot disease in most *Brassica* species).

3.4. Media optimization of potential strains and chemical analyses

Three fungal strains, whose large scale fermentations yield metabolites with interesting chemical structure and/or biological activity, will be selected for media optimization (with at least 15 culture conditions/strain). Large scale fermentation in the optimized media that give promising result (several additional new peaks in HPLC profile and/or stronger biological activity) will be further chemical investigated.

4. Results and Discussion

4.1. Isolation and structure elucidation of bioactive compounds

4.1.1. Spirodioxynaphthalenes from the fungal strain BCC 25093

The fungal strain BCC 25093, isolated from an unidentified mangrove wood, was identified as a member of the order Pleosporales. This fungus was found to produce five new spirodioxynaphthalenes, palmarumycins P₁–P₅ (Figure 1.) and previously described decaspirones A and C, palmarumycins CP₃, CP₄, CP₁₇, CR₁, and M₂, and a known diaryl ether. Palmarumycin P₁ showed antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* K1 with an IC₅₀ value of 2.36 µg/ml, and exhibited antituberculosis activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra with a MIC value of 1.56 µg/ml. Cytotoxicity to Vero cells was observed for this compound with an IC₅₀ value of 0.79 µg/ml.

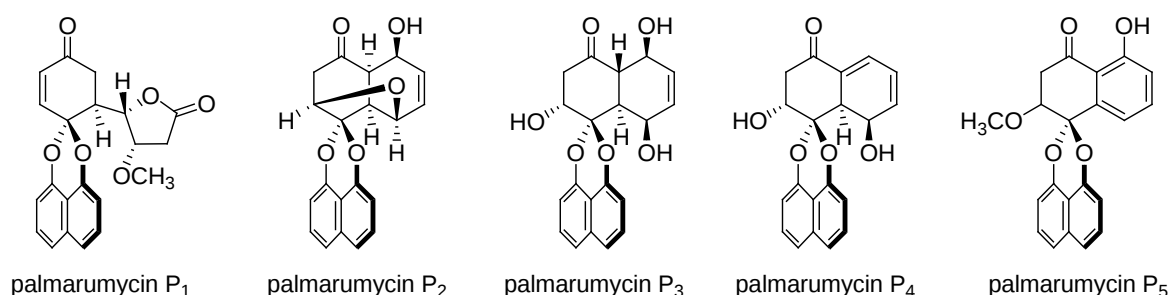


Figure 1. Structures of palmarumycins P₁–P₅.

4.1.2. A pyrone, naphthoquinone, and cyclic urea from the marine-derived fungus *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335

Study of the large scale fermentation of *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335, isolated from *Nypa fruticans*, led to the isolation and structure elucidation of three new compounds, astronypyrone, astronyquinone, and astronyurea, together with four known compounds, xestodecalactones A and B, *ent*-coryoctalactone B, and dimethoxy-O-methylpulvinone

(Figure 2.). The known compound, dimethoxy-*O*-methylpulvinone, displayed antimalarial activity with an IC_{50} value of 5.7 $\mu\text{g/ml}$. Astronyquinone showed weak antituberculosis with a MIC value of 50 $\mu\text{g/ml}$, and exhibited cytotoxic activity against Vero cell lines with an IC_{50} value of 17.4 $\mu\text{g/ml}$.

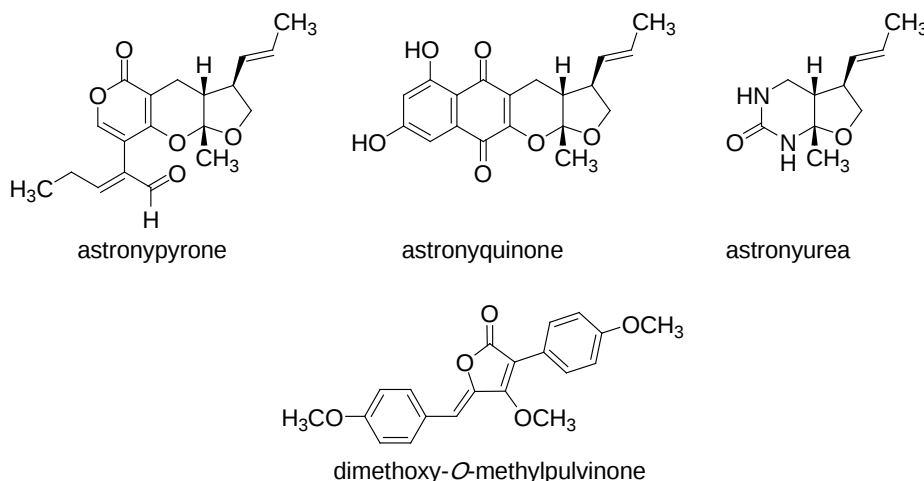


Figure 2. Structures of astronypyrone, astronyquinone, astronyurea, and a known dimethoxy-*O*-methylpulvinone.

4.1.3. Trichothecenes from the fungus *Acremonium crotoncinigenum* BCC 20012

Two new trichothecenes and a new chloroderivative of a trichothecene analogue (Figure 3.) together with four known trichothecenes, crotoncin, trichothecin, 8-deoxytrichothecinol B, and a trichothecene analogue, were isolated from the fungus *Acremonium crotoncinigenum* BCC 20012. A new trichothecene, 7-dehydro-8-dehydroxytrichothecinol B showed antimalarial activity with an IC_{50} value of 3.28 $\mu\text{g/ml}$, and displayed cytotoxic activity against Vero cell lines with an IC_{50} value of 11.37 $\mu\text{g/ml}$. Among the tested metabolites, a known trichothecin showed strongest antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* K1, and cytotoxic activity against Vero cell lines with IC_{50} values of 0.05 and 0.13 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

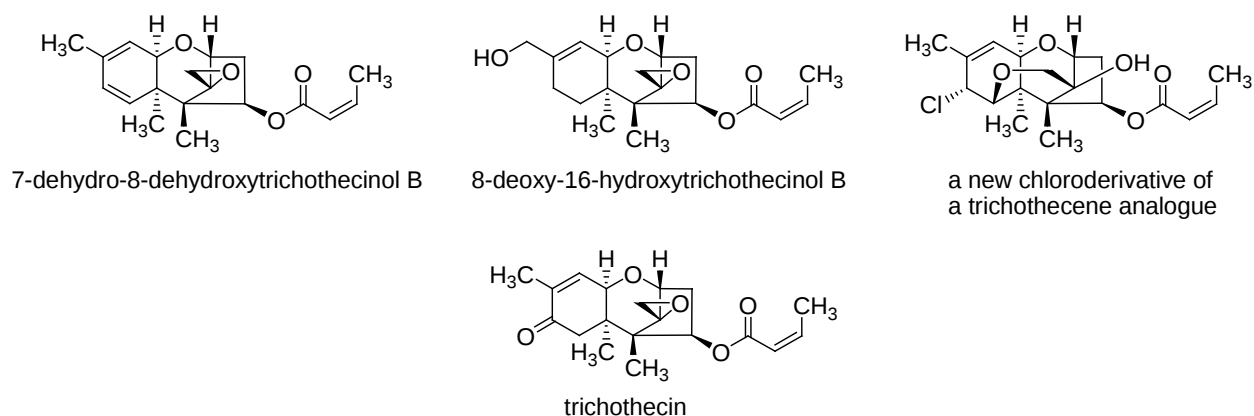


Figure 3. Two trichothecenes, a chloroderivative of a trichothecene analogue and a known trichothecin.

4.1.4. Eremophilanes from the fungus *Nemania maritima* BCC 64093

Chemical investigation of the fungus *Nemania maritima* BCC 64093 led to the isolation and identification of 9 new (Figure 4.) and 4 known eremophilanes. Of these, 11 compounds were evaluated for biological activities including antimalarial (against *Plasmodium falciparum* K1), and antibacterial (against *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecium*) activities. Unfortunately, they were inactive for all assays. Only two compounds showed weak cytotoxic activity against Vero cell lines.

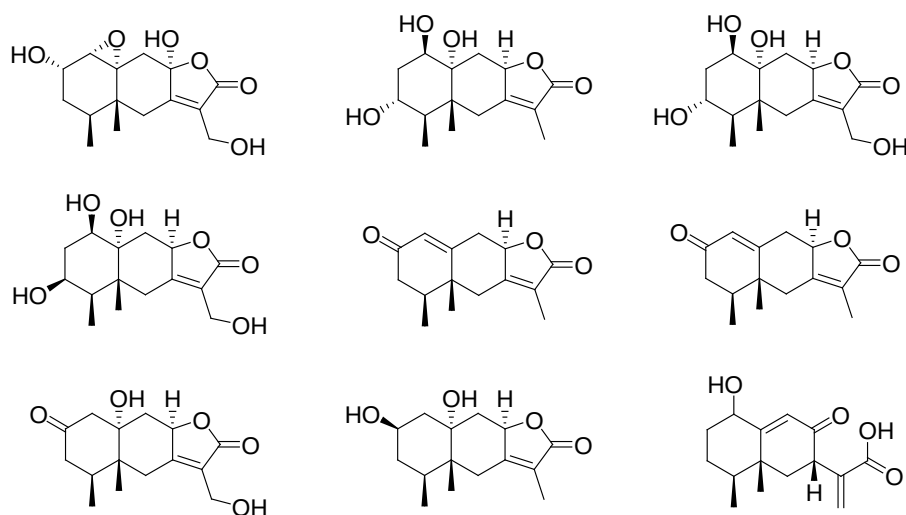


Figure 4. Structures of nine new eremophilanes.

4.2. Media optimization of potential strains and chemical analyses

Media optimization of three fungal strains including *Trimmatostroma* sp. (AK0101), *Astrosphaeriella nypae* (SPP27-1), and *Platystomum scabridisporium* (SAT01364), have

been investigated. Of these, only one fungus, *Trimmatostroma* sp. (AK0101), gave interesting result. Its HPLC profiles in solid media provided peaks that are different in retention times and UV spectra to those observed in the liquid media (including the original medium, LL). Therefore, large scale fermentation of this fungus in a solid medium will be further studied and compared with the result obtained from a liquid medium LL.

5. Conclusion

Chemical investigation of four fungi, including the fungal strain BCC 25093 belonging to the order Pleosporales, the marine-derived fungus *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335, the fungus *Acremonium crotocinigenum* BCC 20012, and the fungus *Nemania maritima* BCC 64093, led to the isolation and structure elucidation of 20 new and 20 known compounds. Among isolated new secondary metabolites, a new spirodioxynaphthalene, palmarumycin P₁, from the fungus BCC 25093 showed antimalarial activity, antituberculosis activity, and cytotoxicity to Vero cells with IC₅₀ = 2.36 µg/ml, MIC = 1.56 µg/ml, and IC₅₀ = 0.79 µg/ml, respectively. A new naphthoquinone, astronyquinone, from *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335 exhibited weak antituberculosis activity with a MIC value of 50 µg/ml, while a new trichothecene, 7-dehydro-8-dehydroxytrichothecinol B, from *Acremonium crotocinigenum* BCC 20012 showed antimalarial activity with an IC₅₀ value of 3.28 µg/ml, and displayed cytotoxic activity against Vero cell lines with an IC₅₀ value of 11.37 µg/ml.

6. Future plan

Large scale fermentation of *Trimmatostroma* sp. (AK0101) in a rice (+ salt) medium will be chemically investigated and compared with that in a LL liquid medium. More marine fungal strains will be screened and explored for their potency to produce bioactive secondary metabolites. Some selected groups of marine fungi such as mangrove endophytic fungi and fungi associated with algae and corals will be focused.

สารบัญ

หน้า

บทสรุปผู้บริหาร.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาของโครงการ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 แผนการดำเนินการ.....	2
บทที่ 2 ความรู้พื้นฐาน และวรรณกรรม (literature) ที่เกี่ยวข้องกับโจทย์วิจัย.....	4
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย.....	11
บทที่ 4 ผลการศึกษา และบทสรุป.....	18
บทที่ 5 ผลลัพธ์และประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัย.....	52
5.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ.....	52
5.2. ผลงานอื่นๆ (เช่น การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ)	52
เอกสารอ้างอิง.....	53
ภาคผนวก.....	56
ภาคผนวก ก. ผลงานตีพิมพ์ในหัวข้อเรื่อง “Palmarumycins from the mangrove fungus BCC 25093”	56
ภาคผนวก ข. ผลงานตีพิมพ์ในหัวข้อเรื่อง “A pyrone, naphthoquinone, and cyclic urea from the marine-derived fungus <i>Astrosphaeriella nypae</i> BCC 5335”	64
ภาคผนวก ค. ผลงานตีพิมพ์ในหัวข้อเรื่อง “Trichothecenes from the Fungus <i>Acremonium crotocinigenum</i> BCC 20012”	68

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1.	สารใหม่ที่ถูกค้นพบจากราทะเลในแต่ละปี.....	4
รูปที่ 2.	โครงสร้างของสารที่แยกได้จากเชื้อราทะเล BCC 25093 ซึ่งอยู่ใน order Pleosporales.....	21
รูปที่ 3.	โครงสร้างของสารที่แยกได้จากเชื้อราทะเล <i>Astrosphaeriella nypae</i> BCC 5335 (SPP27-1)	23
รูปที่ 4.	โครงสร้างของสาร trichothecenes ที่แยกได้จากเชื้อรา <i>Acremonium crotoicinigenum</i> BCC 20012.....	24
รูปที่ 5.	โครงสร้างของสารที่แยกได้จากเชื้อรา <i>Nemania maritima</i> (MCR00056).....	26
รูปที่ 6.	โครงสร้างของ phomoidride A ที่แยกได้จากเชื้อรา <i>Platystomum scabridisporium</i> ...	26
รูปที่ 7.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากอาหารแข็งเปล่า ๆ เพื่อใช้เปรียบเทียบ.....	29
รูปที่ 8.	HPLC chromatogram ของสารสกัด เปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเชื้อรา <i>Astrosphaeriella nypae</i> BCC 5335 (SPP27-1).....	30
รูปที่ 9.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Astrosphaeriella nypae</i> BCC 5335 (SPP27-1) ที่เลี้ยงใน LCN, LCNS, LCNnico, PDB และ PDBS.....	31
รูปที่ 10.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Astrosphaeriella nypae</i> BCC 5335 (SPP27-1) ที่เลี้ยงใน Jackson, Tekeuchi และ Cpz malt.....	32
รูปที่ 11.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Astrosphaeriella nypae</i> BCC 5335 (SPP27-1) ที่เลี้ยงใน SDB, YOS และ YESD.....	33
รูปที่ 12.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Astrosphaeriella nypae</i> BCC 5335 (SPP27-1) ที่เลี้ยงใน GMixN, MMixN และ GMV.....	34
รูปที่ 13.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Astrosphaeriella nypae</i> BCC 5335 (SPP27-1) ที่เลี้ยงใน Rice, RiceS และ RiceNS.....	35
รูปที่ 14.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Astrosphaeriella nypae</i> BCC 5335 (SPP27-1) ที่เลี้ยงใน Rice, Bran, Corn และ Soy.....	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่ 15.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Trimmatostroma</i> sp. (AK0101) ที่เลี้ยงใน LL, LLS, LCNico, PDB และ PDBS.....	37
รูปที่ 16.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Trimmatostroma</i> sp. (AK0101) ที่เลี้ยงใน Jackson, Tekeuchi และ Cpz malt.....	38
รูปที่ 17.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Trimmatostroma</i> sp. (AK0101) ที่เลี้ยงใน SDB, YOS และ YESD.....	39
รูปที่ 18.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Trimmatostroma</i> sp. (AK0101) ที่เลี้ยงใน GMixN, MMixN และ GMV.....	40
รูปที่ 19.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Trimmatostroma</i> sp. (AK0101) ที่เลี้ยงใน Rice, RiceS และ RiceNS.....	41
รูปที่ 20.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Trimmatostroma</i> sp. (AK0101) ที่เลี้ยงใน Rice, Bran, Corn และ Soy.....	42
รูปที่ 21.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Platystomum scabridisporium</i> (SAT01364) ที่เลี้ยงใน MEB, MEBS, MEBnico, MEB pH5 และ MEB pH8.....	43
รูปที่ 22.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Platystomum scabridisporium</i> (SAT01364) ที่เลี้ยงใน PDB และ PDBS.....	44
รูปที่ 23.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Platystomum scabridisporium</i> (SAT01364) ที่เลี้ยงใน Jackson, Tekeuchi และ Cpz malt.....	45
รูปที่ 24.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Platystomum scabridisporium</i> (SAT01364) ที่เลี้ยงใน SDB, YOS และ YESD.....	46
รูปที่ 25.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Platystomum scabridisporium</i> (SAT01364) ที่เลี้ยงใน GMixN, MMixN และ GMV.....	47
รูปที่ 26.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Platystomum scabridisporium</i> (SAT01364) ที่เลี้ยงใน Rice, RiceS และ RiceNS.....	48
รูปที่ 27.	HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>Platystomum scabridisporium</i> (SAT01364) ที่เลี้ยงใน Rice, Bran, Corn และ Soy.....	49

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1. รายชื่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากราทะเล และแหล่งอ้างอิง.....	5
ตารางที่ 2. อัตราส่วนของ mobile phase ที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย HPLC.....	11
ตารางที่ 3. รายชื่อเชื้อที่เลือกสำหรับการปรับเปลี่ยนสูตรอาหาร.....	13
ตารางที่ 4. ส่วนประกอบของอาหารเดิม.....	15
ตารางที่ 5. ส่วนประกอบของอาหารเหลว.....	16
ตารางที่ 6. ส่วนประกอบของอาหารแข็ง.....	17
ตารางที่ 7. รายชื่อราทะเลที่ได้รับการคัดเลือกจากข้อมูล HPLC.....	18
ตารางที่ 8. รายชื่อราทะเลที่ได้รับการคัดเลือกจากฤทธิ์ทางชีวภาพและข้อมูล HPLC.....	19
ตารางที่ 9. รายชื่อราทะเลที่เลี้ยงในขนาดขยาย (large scale fermentation).....	20
ตารางที่ 10. แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารในกลุ่ม spirodioxynaphthalene ซึ่งแยก จากเชื้อราทะเล BCC 25093.....	22
ตารางที่ 11. แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้จากเชื้อรา <i>Acremonium</i> <i>crotoicinigenum</i> BCC 20012.....	25
ตารางที่ 12. แสดงน้ำหนักสารสกัดจากการปรับเปลี่ยนอาหาร สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เทียบกับสารสกัดจากการเลี้ยงครั้งแรกในขั้นตอนการเลือก (1 st screening).....	28

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงการ

องค์ประกอบเคมีของสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติยังคงมีความสำคัญ สำหรับเป็นสารตั้งต้นในการนำไปพัฒนาเป็นยา เนื่องจากมีโครงสร้างที่ซับซ้อน หลากหลาย บ้างก็มีโครงสร้างพิเศษซึ่งยากแก่การคาดเดา สารที่มีโครงสร้างใหม่ๆ เหล่านี้ น่าจะเป็นตัวเลือกสำคัญในการพัฒนาสู่เป้าหมายใหม่ ๆ ของยา

สิ่งมีชีวิตทางทะเลได้รับการพิสูจน์ว่าเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ¹⁻⁵ จากข้อมูลในปี พ.ศ. 2553 สารประกอบเคมี 4 ตัวที่ได้จากสิ่งมีชีวิตทางทะเลได้รับการรับรองเป็นยา และสารประกอบเคมีอีก 13 ตัวอยู่ระหว่างการประเมินในการทดลองทางคลินิก จากสารเคมีที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตทางทะเล plinabulin เป็นหนึ่งในสารที่อยู่ในขั้นตอนการทดลองทางคลินิกเฟส II⁵ โดย plinabulin เป็นอนุพันธ์ที่ได้มาจากการสังเคราะห์ โดยการดัดแปลงโครงสร้างจาก halimide ซึ่งเป็นสารแยกได้จากเชื้อราทะเล *Aspergillus* sp.⁶ (หรือสาร phenylahistin ที่แยกได้จากเชื้อราทะเล *Aspergillus ustus*)⁷ นอกจาก plinabulin แล้ว เชื้อราทะเลยังได้รับการยอมรับว่าเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตสารทุติยภูมิใหม่ ๆ ที่มีโครงสร้างที่หลากหลายและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ⁸⁻¹⁰

โรคติดเชื้อ เช่น โรคมาลาเรีย วัณโรค และโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย คร่าชีวิตมากกว่า 2.5 ล้านคนต่อปี อีกทั้งยังเป็นปัญหาทางคลินิกและต้องการการรักษาที่เพิ่มมากขึ้นเนื่องจากการดื้อยาดังนั้นการค้นหายาสารประกอบเคมีที่มีโครงสร้างแบบใหม่ ๆ ซึ่งโดยส่วนใหญ่ได้มาจากทรัพยากรธรรมชาติเพื่อการรักษาโรคติดเชื้อเหล่านี้ จึงเป็นเรื่องที่ขาดไม่ได้

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ข้าวและพริกเป็นพืชหลัก 2 ชนิดที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ เชื้อราก่อโรคพืช เช่น *Magnaporthe grisea* (เชื้อรากอโรคไหม้จากเมล็ดข้าว)^{16,17} *Colletotrichum capsici* และ *Colletotrichum gloeosporioides* (เชื้อรากอโรคแอนแทรคโนสในพริก)^{18,19} สามารถลดคุณภาพและปริมาณของข้าว รวมถึงผลผลิตของพริกเป็นอย่างมาก และส่งผลให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ ดังนั้นงานวิจัยทางด้านการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์รวมทั้งเชื้อราทางทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชเหล่านี้ จึงมีความสำคัญเพื่อพัฒนาเป็นสารกำจัดศัตรูพืชซึ่งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สำหรับเป็นทางเลือกให้กับเกษตรกรต่อไปในอนาคต

จากความตระหนักในความสำคัญทั้งทางด้านโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบเคมีที่ได้จากเชื้อราทางทะเล โครงการวิจัยของเราจึงมุ่งเน้นไปที่แหล่งทรัพยากรนี้ โดยทาง BIOTEC Culture Collection หรือ BCC ได้มีการเก็บรักษาและรวบรวมเชื้อราทะเลประมาณ 5,000 สายพันธุ์ ซึ่งมาจาก 220 จินัสเป็นอย่างน้อย ในบรรดาเชื้อราเหล่านี้ มีสายพันธุ์หายาก

รวมอยู่ด้วย เช่น *Astrosphaeriella nypae*, *Dendryphiella arenariae*, *Julella avicenniae*, *Platystomum scabridisporium* และ *Pyrenographa mangrovei* และบางสายพันธุ์ซึ่งมีการรายงานว่าพบได้เฉพาะในประเทศไทย เช่น *Aigialus mangrovis*, *Aigialus rhizophorae* และ *Aigialus stratispora*

เนื่องจากเชื้อราทะเลบางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ช้าและน้อย ซึ่งการเจริญเติบโตของเชื้ออาจมีผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิทั้งในด้านปริมาณและจำนวนสารเมตาบอไลต์ ดังนั้นงานวิจัยก่อนหน้านี้จึงได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต และการผลิตสารทุติยภูมิของราทะเล โดยได้คัดเลือกราทะเล 76 สายพันธุ์ ที่มีความหลากหลายทางอนุกรมวิธาน รวมถึงหลายชนิดที่หายากและมีการรายงานว่าพบเฉพาะในประเทศไทย เป็นตัวแทนในการศึกษา โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจำนวน 8 ชนิด ในสภาวะนิ่ง หลังจากนั้นคัดเลือกราตัวแทน 35 สายพันธุ์จาก 76 สายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้น มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพิ่มเติมอีก 7 ชนิด ทำการเปรียบเทียบชีวมวลและ HPLC profile ของสารสกัดจากแต่ละอาหาร เพื่อเปรียบเทียบการสร้างสารเมตาบอไลต์ ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวพบว่าสารสกัดจากเชื้อหลาย ๆ สายพันธุ์ ซึ่งรวมถึงสายพันธุ์หายาก เช่น *Julella avicenniae* BCC 28357, *Platystomum scabridisporium* BCC 28357 และ *Dendryphiella arenariae* BCC 17999 ให้ HPLC profile ที่น่าสนใจ ซึ่งประกอบด้วย peaks ที่หลากหลาย และไม่ซ้ำกับสารที่เคยแยกได้และเก็บอยู่ใน chemical library ของห้องปฏิบัติการ ดังนั้นข้อมูลจากการทดลองก่อนหน้านี้ รวมทั้งเชื้อราทะเลที่เก็บและรวบรวมใน BCC จะเป็นข้อมูลและแหล่งทรัพยากรที่สำคัญในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ ที่มีศักยภาพในการเป็น lead compound สำหรับโรคติดเชื้อและ/หรือโรคในพืชที่เกิดจากเชื้อรา อีกทั้งงานวิจัยนี้ยังช่วยเพิ่มการใช้ประโยชน์และอาจสามารถเพิ่มมูลค่าให้กับเชื้อราและทรัพยากรชีวภาพของไทยอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1.2.1 เพื่อศึกษาศักยภาพของราทะเล ในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างที่พิเศษและหลากหลาย
- 1.2.2 เพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการเป็น lead compounds สำหรับนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นยา หรือสารเคมีทางการเกษตร
- 1.2.3 เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับทรัพยากรชีวภาพและราทะเลของไทย

1.3 แผนการดำเนินการ

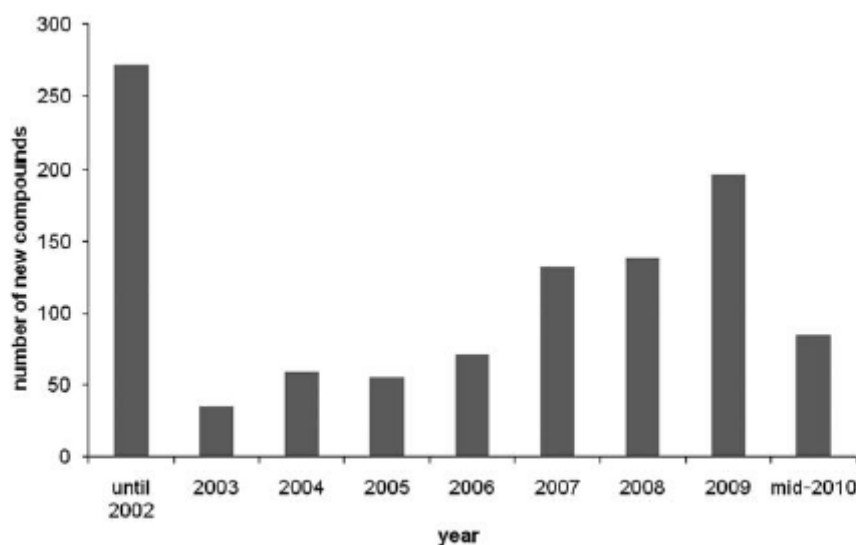
- 1.3.1. คัดเลือกเชื้อราทะเลซึ่งสารสกัด มี HPLC profile ที่น่าสนใจ จำนวน 8-10 สายพันธุ์
- 1.3.2. คัดเลือกเชื้อราทะเลซึ่งสารสกัดแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ จำนวน 7-10 สายพันธุ์
- 1.3.3. ทำการเลี้ยงเชื้อในขนาดขยาย (large scale fermentation) จำนวน 15-20 สายพันธุ์
- 1.3.4. แยกสารบริสุทธิ์ จำนวน 40 ตัว

- 1.3.5. หาโครงสร้างของสารที่แยกได้ และส่งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยได้สารใหม่จำนวน 12 ตัว และได้สารที่เคยมีการรายงานแล้วจำนวน 28 ตัว
- 1.3.6. การปรับเปลี่ยนอาหาร สภาวะในการเลี้ยง สำหรับเชื้อราที่น่าสนใจ 3 ตัว ไม่น้อยกว่า 15 conditions แล้วเปรียบเทียบการสร้างสารเมตาบอไลต์ โดยการวิเคราะห์สารสกัดด้วย HPLC

บทที่ 2

ความรู้พื้นฐาน และวรรณกรรม (literature) ที่เกี่ยวข้องกับโจทย์วิจัย

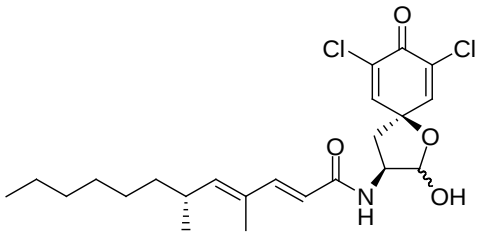
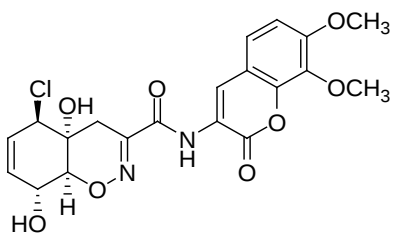
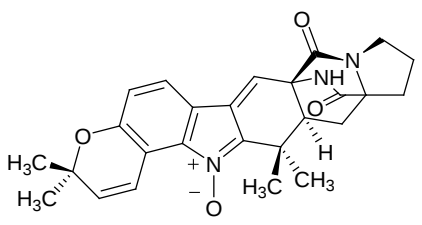
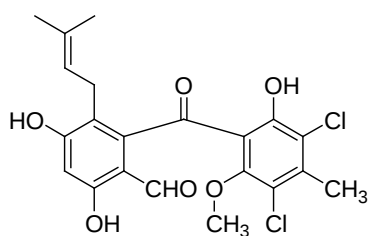
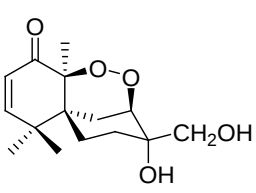
นับจากการค้นพบ penicillins cephalosporins และ cyclosporins องค์ประกอบทางเคมีจากเชื้อราดึงดูดความสนใจในการเป็นแหล่งใหม่สำหรับการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพ เพื่อพัฒนาเป็นยา สาร cephalosporin C ถูกค้นพบจากรา *Cephalosporium acremonium* (ต่อมาได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Acremonium chrysogenus*) ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเลในซาร์ดิเนียตั้งแต่ปี 1949^{8,9} หลังจากนั้น การดัดแปลงโครงสร้างและสังเคราะห์อนุพันธ์ของ cephalosporin ได้นำไปสู่การพัฒนาปฏิชีวนะหลายชนิด นับตั้งแต่การค้นพบ cephalosporin C อีก 30 ปีถัดมา จึงเริ่มมีการค้นหาสารฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อราทะเลอย่างมีระบบ⁸ และนับจากปี 2546 จำนวนของสารใหม่จากเชื้อราทะเลได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยสิ้นปี พ.ศ. 2553 สารใหม่เกือบ 1,000 ตัวได้ถูกค้นพบจากราทะเล⁸

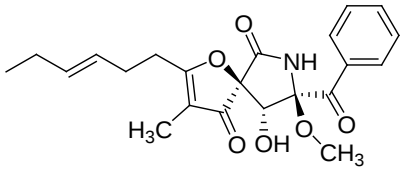
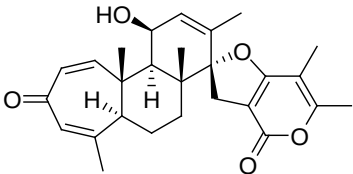
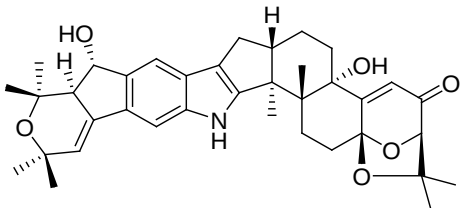
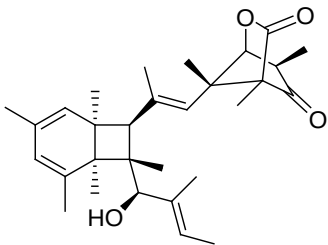
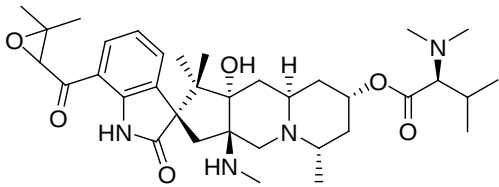
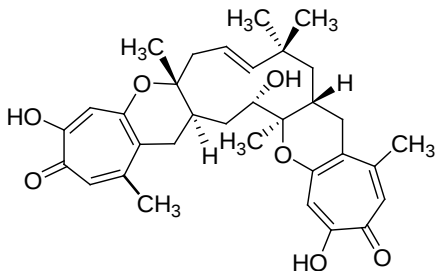


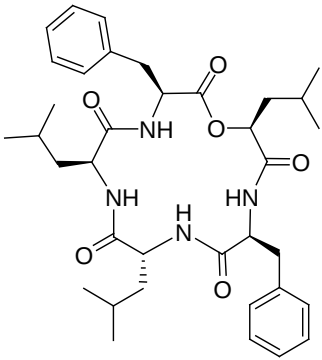
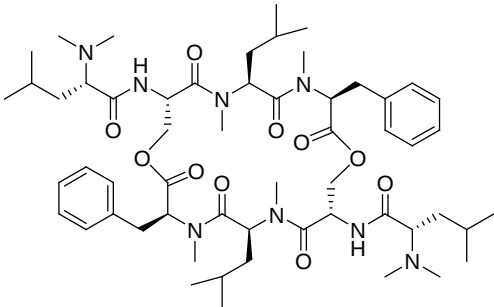
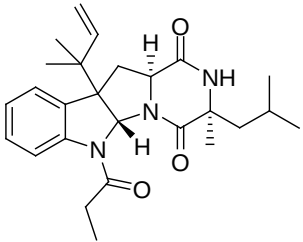
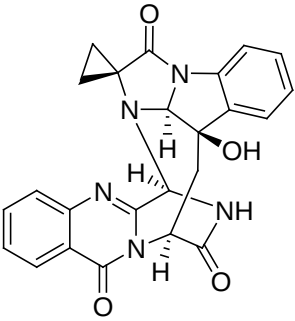
รูปที่ 1. สารใหม่ที่ถูกค้นพบจากราทะเลในแต่ละปี⁹

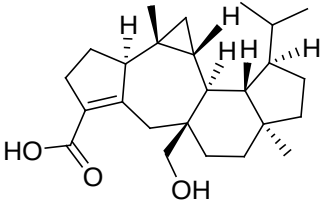
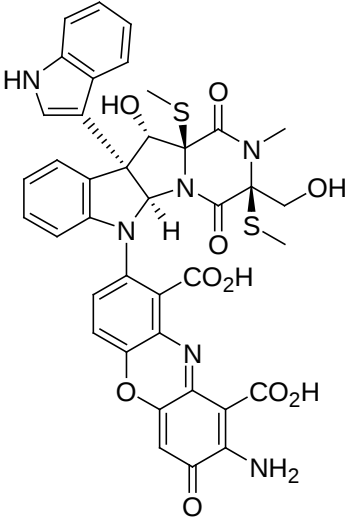
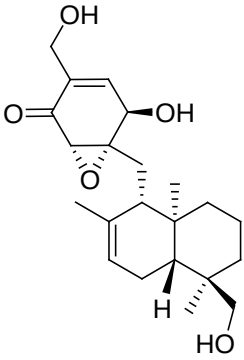
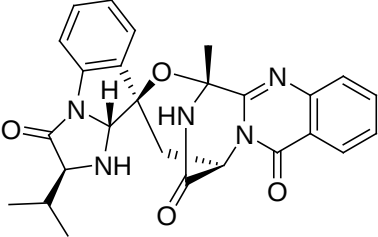
ผลงานที่ผ่านมาเกี่ยวกับการค้นพบสารทุติยภูมิจากราทะเลได้ถูกรวบรวมและตีพิมพ์ในวารสารวิชาการหลายฉบับ โดยสารที่พบอยู่ในกลุ่มต่าง ๆ เช่น polyketides, prenylated polyketides, meroterpenoids, terpenoids, เปปไทด์, อัลคาลอยด์, สารประกอบที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ, สารที่ได้จาก shikimate pathway และไขมัน โดยสารที่ได้จากราทะเลมีความหลากหลายทั้งทางด้านโครงสร้างเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ^{2,8-10} สารที่แยกได้จากราทะเลที่น่าสนใจได้ถูกคัดเลือกและสรุปไว้ในตารางที่ 1

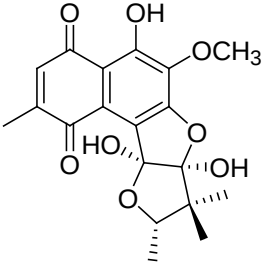
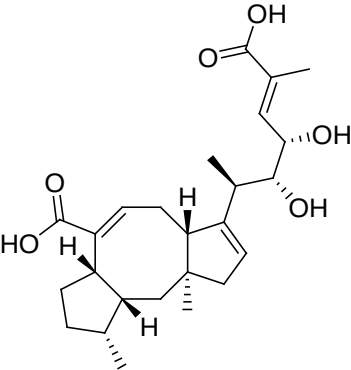
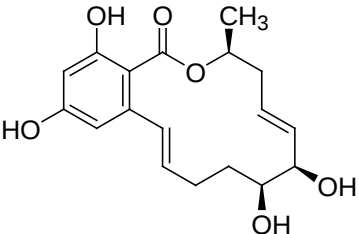
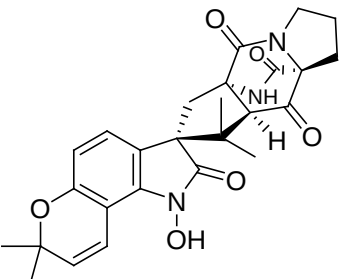
ตารางที่ 1. รายชื่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากราทะเล และแหล่งอ้างอิง

สารประกอบเคมี	แหล่งที่มา (เชื้อราที่ผลิตสาร)	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	เอกสาร อ้างอิง
 $\alpha:\beta = 1:2$ gymnastatins A	<i>Gymnascella dankaliensis</i>	ความเป็นพิษต่อเซลล์ P-338 lymphocytic leukemia ด้วยค่า ED_{50} 18 ng/mL	20
 trichodermamide B	<i>Trichoderma virens</i>	ความเป็นพิษต่อเซลล์ HCT-116 human colon carcinoma ด้วยค่า $IC_{50} = 0.32 \mu\text{g/mL}$	21
 avrainvillamide	<i>Aspegillus</i> sp.	ความเป็นพิษต่อเซลล์	22
 pestalone	<i>Pestalotia</i> sp.	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	23
 merulin C	endophytic fungus ซึ่งอยู่ใน family Meruliaceae	- ความเป็นพิษต่อ human breast cancer cells และ colon cancer cell lines - ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่	24,25

สารประกอบเคมี	แหล่งที่มา (เชื้อราที่ผลิตสาร)	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	เอกสาร อ้างอิง
 cephalimysin A	<i>Aspergillus</i> sp.	ความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 cells (IC_{50} = 15.0 nM) และ HL-60 leukemia cells (IC_{50} = 9.5 nM)	26
 brevione F	<i>Penicillium</i> sp.	HIV-1 replication inhibition with ED_{50} = 14.7 μ M	27
 shearinine D	<i>Penicillium</i> sp.	inhibition of calcium-activated potassium channels)	28
 shimalactone A	<i>Emericella variecolor</i>	ผลต่อระบบเซลล์ประสาทบน neuroblastoma Neuro 2A cell lines	29
 citrinadin A	<i>Penicillium citrinum</i>	ความเป็นพิษต่อเซลล์ murine leukemia และ human epidermoid carcinoma KB cell lines	30
 pycnidione	<i>Phoma</i> sp.	- ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย - ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	31–33

สารประกอบเคมี	แหล่งที่มา (เชื้อราที่ผลิตสาร)	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	เอกสาร อ้างอิง
 zygosporamide	<i>Zygosporium masonii</i>	ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 54 cell lines	34
 IB-01212	<i>Clonostachys sp.</i>	ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	35
 brevicompanine E	<i>Penicillium sp.</i>	ฤทธิ์ยับยั้งการผลิต (LPS)-induced nitric oxide ใน BV2 microglial cells (IC ₅₀ = 27 µg/mL)	36
 cottoquinazoline D	<i>Aspergillus versicolor</i>	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา <i>Candida Albicans</i> (IC ₅₀ = 22.6 µM)	37

สารประกอบเคมี	แหล่งที่มา (เชื้อราที่ผลิตสาร)	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	เอกสาร อ้างอิง
 asperterpenoid A	<i>Aspergillus</i> <i>sp.</i>	ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรค วัณโรค <i>Mycobacterium</i> <i>Tuberculosis</i> protein tyrosine phosphatase B (IC ₅₀ = 2.2 μM)	38
 plectosphaeroic acid A	<i>Plectosphaerella</i> <i>cucumerina</i>	ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ indoleamine 2,3-dioxygenase (IC ₅₀ ≈ 2 μM)	39
 epoxyphomalin A	<i>Phoma</i> <i>sp.</i>	ความเป็นพิษต่อ 36 human tumor cell lines (IC ₅₀ = 0.010-0.937 μg/mL)	40
 aniquinazoline A	<i>Aspergillus nidulans</i>	ความเป็นพิษต่อ brine shrimp (LD ₅₀ = 1.27 μM)	41

สารประกอบเคมี	แหล่งที่มา (เชื้อราที่ผลิตสาร)	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	เอกสาร อ้างอิง
 herqueidiketol	<i>Penicillium sp.</i>	- ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ <i>Straphylococcus aureus</i> sortase A ($IC_{50} = 23.6 \mu M$) - ความเป็นพิษต่อ lung carcinoma A549 cell line ($LC_{50} = 17.0 \mu M$)	42
 halorosellinic acid	<i>Halorosellinia oceanica</i>	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย ($IC_{50} = 23.6 \mu g/mL$)	43
 aigialomycin D	<i>Aigialus parvus</i>	- ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย ($IC_{50} = 6.6 \mu g/mL$) - ความเป็นพิษต่อเซลล์	44
 notoamide A	<i>Aspergillus sp.</i>	ความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa และ L1210 cell lines ($IC_{50} = 27$ และ $29 \mu g/mL$)	45

ดังแสดงในตารางที่ 1 สารเมตาบอไลต์หลายชนิดจากเชื้อราทางทะเลเป็นสารประกอบเคมีที่มีศักยภาพในการเป็น lead compounds โดยแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ ตัวอย่างเช่น

- avrainvillamide ซึ่งเป็นสาร alkaloid ที่แยกได้จากเชื้อราทางทะเล *Asperillus* sp. CNC358 แสดงความเป็นพิษในระดับปานกลางต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT-116) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ แต่พบว่าแสดงความเป็นพิษที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (MALME-3M) และมะเร็งเต้านม ด้วยค่า IC_{50} ที่ต่ำมาก คือ เท่ากับ 53, 34 และ 72 nM ตามลำดับ²²

- pestalone เป็นสารในกลุ่ม benzophenone ที่มี chlorine เป็นองค์ประกอบ แยกได้จากราทะเล *Pestalotia* sp. CNL-365 ซึ่งเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียทะเลเซลล์เดี่ยว CNJ-328 สาร pestalone แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา methicillin ด้วยค่า MIC ที่ 37 ng/mL และยับยั้ง *enterococcus faecium* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา vancomycin ด้วยค่า MIC ที่ 78 ng/mL²³

- pycnidione เป็นสาร bistropolone-sesquiterpene ซึ่งแยกจากเชื้อรา *Phoma* sp. โดยมีการรายงานว่า pycnidione สามารถยับยั้งการแตกของ β -casein โดย stromelysin ด้วยค่า IC_{50} 31 μM ³¹ ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ด้วยค่า IC_{50} 0.15-0.4 μM ³² และมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ผ่านการชักนำการหยุดวัฏจักรของเซลล์และการตายของเซลล์³³

- zygosporamide เป็นสาร cyclic pentadepsipeptide ซึ่งแยกได้จากเชื้อราทะเล *Zygosporium masonii* สารนี้แสดงฤทธิ์ความพิษอย่างมีนัยสำคัญและมีฤทธิ์ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งระบบประสาทส่วนกลาง SF-268 ($GI_{50} = 6.5 \text{ nM}$) และเซลล์มะเร็งไต RXF 393 ($GI_{50} \leq 5.0 \text{ nM}$) เมื่อเทียบกับค่ามาตรฐานของความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งอื่น ๆ 54 เซลล์ ($GI_{50} = 9.1 \mu\text{M}$)³⁴

จากข้อมูลดังกล่าวมาทั้งหมดนี้ แสดงให้เห็นว่าราทะเลมีศักยภาพในการเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ โดยสารเมตาบอไลต์จากราทะเลหลายตัวมีความเป็นไปได้ในการเป็น lead compound ดังนั้นการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อราทะเลที่เก็บและรวบรวมอยู่ในประเทศไทย จึงเป็นเรื่องที่จำเป็นและสำคัญ เพื่อค้นหาสารเมตาบอไลต์ ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ ที่น่าสนใจและมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาหรือสารมูลค่าเพิ่มต่อไป

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 การเลือกเชื้อราทะเล

3.1.1 จากการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเจริญและการสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิของราทะเล เพื่อให้ได้อาหารที่เหมาะสม 3 ชนิดสำหรับเป็นพื้นฐานในการคัดกรองราทะเลที่น่าสนใจสำหรับค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของหน่วยปฏิบัติการวิจัยทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ โดยได้คัดเลือกเชื้อราสำหรับเป็นตัวแทนจำนวน 76 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหาร 25 mL ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่าง ๆ กัน 8 ชนิด ในสถานะไม่เขย่า ทำการสกัดราทะเลที่เลี้ยงได้ (ทั้งส่วนเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อรวมเข้าด้วยกัน) ด้วยตัวทำละลาย EtOAc + 0.01% acetic acid (25 mL) นำส่วนตัวทำละลายอินทรีย์มาระเหยให้แห้ง จากนั้นละลายตัวอย่างด้วย MeOH (ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL) แล้วทำการฉีดด้วย injection volume 5 μ L และวิเคราะห์ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Purospher® RP-18 endcapped (3 μ m) LiChroCART® 55-2 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใช้ mobile phase คือ H_2O + 0.01% formic acid (solvent A) และ CH_3CN + 0.01% formic acid (solvent B) โดยมีอัตราส่วนของ mobile phase ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2. อัตราส่วนของ mobile phase ที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย HPLC

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	0.5	100	0
10	0.5	0	100
12.2	0.5	0	100
12.3	0.5	100	0
15	0.5	100	0

ทำการบันทึกข้อมูลด้วย Photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 190-600 nm โดยจำนวนของ peaks (ที่ 210 nm) รวมทั้ง UV spectrum และตำแหน่งของ peaks ที่น่าสนใจจะถูกนำมาวิเคราะห์ และเปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกเชื้อราทะเลที่จะนำมาศึกษาและค้นหาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยแยกได้มาก่อน

3.1.2 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทางด้านอนุกรมวิธานประมาณ 200 สายพันธุ์ ได้ถูกนำไปเลี้ยงในอาหารและสถานะต่าง ๆ กัน ในปริมาณ 25 mL ทำการสกัดราทะเลที่เลี้ยงได้ (ทั้งส่วน

เซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อรวมเข้าด้วยกัน) ด้วยตัวทำละลาย EtOAc + 0.01% acetic acid (25 mL) นำส่วนตัวทำละลายอินทรีย์มาระเหยให้แห้ง นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งรวมถึงฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อให้เกิดโรคในพืช เช่น โรคใบไหม้ในข้าว โรคแอนแทรคโนสในพริก ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย เชื้อวัณโรค เชื้อราและเชื้อแบคทีเรียก่อโรค นอกจากนี้ส่วนของสารสกัดยังได้ถูกนำมาทำการฉีดและวิเคราะห์ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ condition ที่กล่าวไปข้างต้น ข้อมูลจาก HPLC และผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ จะมีส่วนในการเลือกสายพันธุ์เชื้อที่จะนำไปเลี้ยงในขนาดที่ใหญ่ขึ้นเพื่อแยกหาสารออกฤทธิ์ต่อไป

3.2 การเลี้ยงเชื้อในขนาดขยาย (large scale fermentation)

ทำการเพาะเชื้อราที่คัดเลือกบนอาหารแข็ง (PDA: Potato dextrose agar) ที่ 25 °C จากนั้นทำการตัดชิ้นวันที่มีการเจริญของเชื้อขนาด $1 \times 1 \text{ cm}^2$ (จำนวน 4 หรือ 8 ชิ้น) ให้มีขนาดเล็ก ๆ ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 mL (จำนวน 4 หรือ 8 flasks) ซึ่งในแต่ละ flask มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB (Potato dextrose broth) ในปริมาณ 25 mL หลังจากทำการบ่มในสภาวะเขย่า เป็นเวลา 4–7 วัน (แล้วแต่การเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละสายพันธุ์) ทำการถ่ายเชื้อแต่ละ flask (25 mL) ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 1 L ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ในปริมาณ 250 mL (จำนวน 4 หรือ 8 flasks) หลังจากนั้น ทำการบ่มในสภาวะเขย่า เป็นเวลา 4-7 วัน ทำการถ่ายเชื้อที่ได้ทุก ๆ 25 mL ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 1 L ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (production medium ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับตอนที่คัดเลือก) ในปริมาณ 250 mL ทำการบ่มเชื้อในสภาวะเดียวกันกับตอนที่เลี้ยงขนาดเล็กสำหรับคัดเลือกเชื้อรา ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อทั้งหมด 10 หรือ 20 L เพื่อทำการสกัดและแยกต่อไป

3.3 การสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี

3.3.1 การสกัด

ทำการกรองแยกส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์ นำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ มาสกัดด้วย EtOAc (ด้วยปริมาตรที่เท่ากันกับอาหารเลี้ยงเชื้อ) จำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการระเหยชั้น EtOAc จะได้เป็นสารสกัดในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับส่วนของเซลล์ทำการแช่ใน MeOH กรองส่วนของเซลล์ออก แล้วสกัดด้วย Hexane ส่วนของ Hexane นำมาระเหยให้แห้งจะได้ส่วนของสารสกัดของเซลล์ในชั้น Hexane ส่วนของชั้น MeOH นำไประเหยให้แห้ง ละลายด้วย EtOAc เติมน้ำ และสกัดแยก ส่วนของ EtOAc นำมาระเหยให้แห้ง จะได้สารสกัดจากเซลล์ในชั้น EtOAc

3.3.2 การแยกสารให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดในส่วนที่สนใจ ทำการแยกด้วย Sephadex LH-20 column chromatography, silica gel column chromatography และ/หรือ preparative-HPLC เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ สารบริสุทธิ์ที่ได้จะถูกนำไปตรวจวัด เพื่อให้ได้ข้อมูล 1D (^1H and ^{13}C) และ 2D NMR (NOESY, COSY,

HMQC, HMBC) spectroscopy และ mass spectrometry เพื่อใช้ในการโครงสร้างทางเคมี ส่วนสารที่มีปริมาณมากพอที่จะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับหลอดทดลอง ประกอบด้วย

- ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* K1
- ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra
- ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Enterococcus faecium* และ *Acinetobacter baumannii* เป็นต้น
- ฤทธิ์ต้านเชื้อรา เช่น *Colletotrichum capsici* และ *Colletotrichum gloeosporioides* (เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก) *Curvularia lunata* (เชื้อราก่อโรคเมล็ดดำในข้าว) และ *Alternaria brassicicola* (เชื้อราก่อโรคใบจุดในพืชคะน้า)

3.5 การปรับเปลี่ยนอาหาร สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ และเปรียบเทียบการสร้างสารเมตาบอไลต์ โดยการวิเคราะห์สารสกัดด้วย HPLC

ทำการเลือกเชื้อราทะเล 3 สายพันธุ์ ที่มีการสร้างสารทุติยภูมิที่น่าสนใจ หรือสารสกัดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3. รายชื่อเชื้อที่เลือกสำหรับการปรับเปลี่ยนสูตรอาหาร

No.	Original code	Scientific Name	Culture medium	เวลาในการเลี้ยง (วัน)	เหตุผลในการเลือก
1	SPP27-1	<i>Astrosphaeriella nypae</i>	LCN	21	พบสารที่มีโครงสร้างหลากหลาย(รายละเอียดตั้งในข้อ 4.3.2)
2	AK0101	<i>Trimmatostroma</i> sp.	LL	27	สารสกัดจาก small scale culture แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก <i>Enterococcus faecium</i> ด้วยค่า MIC = 12.5 µg/mL
3	SAT01364	<i>Platystomum scabridisporium</i>	MEB	30	พบสารที่มีโครงสร้างที่น่าสนใจ ได้แก่ phomoidride A (รายละเอียดตั้งในข้อ 4.3.5)

ทำการปรับเปลี่ยนอาหาร สภาวะในการเลี้ยง โดยอาหารที่ใช้ในการศึกษา ประกอบด้วย

3.5.1 อาหารเหลว โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวปริมาตร 25 mL ใน erlenmeyer flask ขนาด 250 mL

3.5.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งอ้างอิงจากอาหารเดิม (รายละเอียดดังตารางที่ 4) ประกอบด้วย

(1) อาหารเดิม (**LL**, **LCN** หรือ **MEB**)

(2) อาหารเดิม + เกลือ (**LLS**, **LCNS** หรือ **MEBS**)

เนื่องจากเชื้อราที่ศึกษาเป็นราทะเล ดังนั้นการใส่เกลืออาจจะมีผลต่อการเจริญ และการสร้าง secondary metabolite ของเชื้อ

(3) อาหารเดิม + nicotinamide (10 μ M) (**LLnico**, **LCNnico** หรือ **MEBnico**)

โดย nicotinamide มีการรายงานว่า เป็น NAD^+ -dependent histone deacetylase inhibitor ซึ่งการเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจมีผลต่อ transcriptional upregulation ของ biosynthetic gene cluster และอาจเพิ่ม ประสิทธิภาพในการสร้างสาร secondary metabolite ของเชื้อรา

3.5.1.2 อาหารเหลวมาตรฐาน

(1) Potato Dextrose Broth (**PDB**: ประกอบด้วย potato starch 4 g/L และ dextrose 20 g/L)

(2) Potato Dextrose Broth + artificial sea salt (3 % หรือ 30 g/L) (**PDBS**)

3.5.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจาก literatures จำนวน 6 อาหาร ได้แก่ **Jackson**, **Tekeuchi**, **Czapek malt (Czp malt)**, **SDB**, **YOS** และ **YESD** โดยมีส่วนประกอบของอาหาร ดังตารางที่ 5

3.5.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีปริมาณน้ำตาลไม่สูงมากนัก มีการเติม nitrogen source หลาย ๆ ชนิด หรือเติม vitamin และ trace element ต่าง ๆ (ส่วนประกอบของอาหารดัง ตารางที่ 5)

(1) น้ำตาล glucose + nitrogen source หลาย ๆ ประเภท (**GMixN**)

(2) น้ำตาล maltose + nitrogen source หลาย ๆ ประเภท (**MMixN**)

(3) น้ำตาล glucose + monosodium glutamate (MSG) + trace element + vitamin (**GMV**)

3.5.2 อาหารแข็ง (รายละเอียดของส่วนประกอบอาหารดังตารางที่ 6) ประกอบด้วย

(1) ข้าว (**Rice**)

(2) ข้าว + เกลือ (**RiceS**)

(3) ข้าว + เกลือ + nitrogen sources (**RiceNS**)

(4) รำข้าว (**Bran**)

(5) ข้าวโพด (**Corn**)

(6) กากถั่วเหลือง (**Soy**)

ตารางที่ 4. ส่วนประกอบของอาหารเต็ม (จากข้อ 3.5.1.1, หน่วย g/L)

		MEB	LL	LCN	MEBS	LLS	LCNS
C-source	Glucose	-	-	10	-	-	10
	Malt extract	6	-	-	6	-	-
	Maltose	1.8	-	-	1.8	-	-
	Mannitol	-	20	10	-	20	10
	Dextrose	6	-	-	6	-	-
N-source	Yeast extract	1.2	1	5	1.2	1	5
	Cotton seed	-	10	-	-	10	-
	Soytone	-	2	5	-	2	5
	NZ amine type A	-	2	-	-	2	-
	Trace element¹	-	0.25 mL/L	0.25 mL/L	-	0.25 mL/L	0.25 mL/L
	Artificial sea salt	-	-	-	30	30	30

¹ Trace element ประกอบด้วย $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g, KI 0.05 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g และ H_2SO_4 1 mL ในน้ำกลั่น 1 L

ตารางที่ 5. ส่วนประกอบของอาหารเหลว (จากข้อ 3.5.1.3 และ 3.5.1.4, หน่วย g/L)

		Jackson ¹	Tekeuchi ¹	Czp malt ²	SDB ³	YOS ⁴	YESD ⁵	GMixN	MMixN	GMV
C-source	Glycerol	15	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sugar cane	15	-	-	-	-	-	-	-	-
	Starch	-	25	-	-	-	-	-	-	-
	Glucose	-	20	30	40	20	-	10	-	10
	Malt extract	-	-	20	-	-	-	-	-	-
	Maltose	-	-	-	-	-	-	-	10	-
	Dextrose	-	-	-	-	-	20	-	-	-
N-source	Tryptone	-	-	-	10	5	-	1	2	-
	Peptone	6	-	-	-	-	20	1	2	-
	Yeast extract	1.5	-	-	-	3	5	1	2	-
	Casamino	-	10	-	-	-	-	-	-	-
	Soytone	-	-	-	-	-	-	1	2	-
	MSG	-	-	-	-	-	-	1	2	1
Metal & Element	NaCl	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	NaNO ₃	-	-	3	-	-	-	-	-	-
	KH ₂ PO ₄	0.6	5	1	-	3	-	-	-	-
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	2.5	0.5	-	1	-	-	-	-
	KCl	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	0.01	-	-	-	-	-	-
	Trace element ⁶	0.5 mL/L	-	-	-	-	-	-	-	0.25 mL/L
	Vitamin ⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	2 mL/L

¹ Elias, B. C.; Said, S.; de Albuquerque, S; Pupo, M. T. *Microbiol. Res.* **2006**, *161*, 273-280.² Wang, M.; He, H.; Na, K.; Cai, M.; Zhou, X.; Zhao, W.; Zhang, Y. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 2012-2018.³ Pu, X.; Qu, X.; Chen, F.; Bao, J.; Zhang, G; Luo, Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 9365-9375.⁴ Hewage, R. T. ; Aree, T. ; Mahidol, C. ; Ruchirawat, S. ; Kittakoop, P. *Phytochemistry*, **2014**, *108*, 87-94.⁵ VanderMolen, K. M.; Raja, H. A.; El-Elmat, T; Oberlies, N. H. *AMB Express* **2013**, *3*, 71.⁶ Trace element ประกอบด้วย CaCl₂·2H₂O 4 g, ZnSO₄·7H₂O 2 g, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.1 g, FeSO₄·7H₂O 5 g, KI 0.05 g, CoCl₂·6H₂O 0.5 g, CuSO₄·5H₂O 0.2 g, MnCl₂·4H₂O 2 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.05 g และ H₂SO₄ 1 mL ในน้ำกลั่น 1 L⁷ Vitamin ประกอบด้วย BLACKMORES multivitamins + minerals จำนวน 3 เม็ด ในน้ำ 100 mL

ตารางที่ 6. ส่วนประกอบของอาหารแข็ง (จากข้อ 3.5.2, เลี้ยงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 mL)

		Rice	RiceS	RiceNS	Bran	Corn	Soy
C&N-source	ข้าว	50 g	50 g	50 g	-	-	-
	รำข้าว	-	-	-	50 g	-	-
	เมล็ดข้าวโพด	-	-	-	-	50 g	-
	กากถั่วเหลือง	-	-	-	-	-	50 g
N-source	Peptone	-	-	0.25 g	-	-	-
	Yeast extract	-	-	0.25 g	-	-	-
Artificial sea salt		-	1.25 g	1.25 g	-	-	-
น้ำกลั่น		50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL

โดยได้ทำการเลี้ยงเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารดังกล่าวข้างต้น สำหรับอาหารเหลวเลี้ยงในปริมาตร 25 mL ส่วนอาหารแข็งตามปริมาณในตารางที่ 5 (ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 mL) โดยทุกอาหารทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21-30 วัน (ระยะเวลาในการเลี้ยง อ้างอิงจากอาหารเดิม ดังตารางที่ 3) สำหรับอาหารเหลวทำการสกัดส่วนของเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อรวมกันด้วยตัวทำละลาย EtOAc + 0.01% acetic acid (25 mL) ส่วนของอาหารแข็ง แช่ในตัวทำละลาย EtOAc + 0.01% acetic acid (25 mL) เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วกรอง หลังจากนั้นทั้งสำหรับอาหารเหลวและอาหารแข็ง นำส่วนตัวทำละลายอินทรีย์มาระเหยให้แห้ง ซึ่งน้ำหนักรวบรวมแล้วละลายสารสกัดด้วย MeOH (ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL) แล้วทำการวิเคราะห์ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Purospher® RP-18 endcapped (3 µm) LiChroCART® 55-2 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วย injection volume 5 µL ใช้ mobile phase คือ H₂O + 0.01% formic acid (solvent A) และ CH₃CN + 0.01% formic acid (solvent B) โดยมีอัตราส่วนของ mobile phase ดังตารางที่ 1

ทำการเปรียบเทียบ HPLC profiles ของสารสกัด หลังการปรับเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อกับอาหารเดิม สำหรับเชื้อที่มีการสร้างสารทุติยภูมิที่แตกต่างออกไปจากเดิมและน่าสนใจ จะมีการนำไปเลี้ยงในขนาดขยาย แล้วทำการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์และหาโครงสร้างทางเคมีต่อไป

บทที่ 4

ผลการศึกษา และบทสรุป

4.1 การคัดเลือกเชื้อราทะเล

4.1.1 จากการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเจริญและการสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิของราทะเล สามารถคัดเลือกเชื้อราทะเลที่น่าสนใจได้ 8 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 7 จากจำนวนทั้งหมด 76 สายพันธุ์ โดยใช้ข้อมูลจาก HPLC profile

ตารางที่ 7. รายชื่อราทะเลที่ได้รับการคัดเลือกจากข้อมูล HPLC

No.	Original code	Scientific Name	Culture medium
1	SAT00832	<i>Julella avicenniae</i>	PYGM
2	JS00240	<i>Periconia prolifica</i>	4G
3	SAT01364	<i>Platystomum scabridisporium</i>	MEB
4	SAT01366	<i>Tirisporella beccariana</i>	GlyPy
5	SPP27-1	<i>Astrosphaeriella nypae</i>	LCN
6	SAT00337	<i>Phaeosphaeria macrosporidium</i>	LS2
7	NBRC 30420	<i>Zopfiella marina</i>	4G
8	SAT00815	<i>Trematosphaeria mangrovis</i>	4G

4.1.2 จากการคัดกรองพื้นฐานของหน่วยปฏิบัติการวิจัยทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ซึ่งทำการเลือกเชื้อราทะเลที่มีความหลากหลายทางด้านอนุกรมวิธาน ประมาณ 200 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด ทั้งแบบเขย่าและไม่เขย่า สามารถคัดเลือกเชื้อราทะเลซึ่งสารสกัดแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพและ HPLC profile ที่น่าสนใจ 10 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8. รายชื่อราทะเลที่ได้รับการคัดเลือกจากฤทธิ์ทางชีวภาพและข้อมูล HPLC

No.	Original code	Scientific Name	Culture medium	Activity (IC ₅₀ or MIC, µg/mL)
1	GR00235	<i>Zalerion vari</i>	Bio27	BC:50 cyto:3.81 PF:0.645
2	MD01920	<i>Fusarium equiseti</i>	4G	EF:50 CL:50 CC:12.5 CG:12.5 cyto:17.11
3	MD00972	<i>Phomopsis</i> sp.	LL	CC:12.5 CG:12.5
4	MD01871	Unidentified	PDB	ABr:50
5	MD00780	Unidentified	PDB	ABr:12.5 CL:50 CC:6.25 CG:6.25
6	JS1006	Unidentified	Bio27	ABa:16.67 EF:6.25 CC:12.5
7	AK0101	<i>Trimmatostroma</i> sp.	LL	EF:12.5 cyto:16.27
8	MCR00056	<i>Nemania maritima</i>	PDB	EF:12.5
9	AK0093	<i>Halorosellinia oceanica</i>	PDB	EF:12.5
10	MD01703	<i>Rhizopycnis</i> sp.	LL	EF:50 CC:6.25 CG:6.25

Note: ABa = ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter baumannii*
 ABr = ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Alternaria brassicicola*
 BC = ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus*
 CC = ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก *Colletotrichum capsici*
 CG = ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก *Colletotrichum gloeosporioides*
 CL = ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าว *Curvularia lunata*
 cyto = ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ปกติจากไตของลิง [African green monkey kidney fibroblast (Vero) cells]
 EF = ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Enterococcus faecium*
 PF = ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum*

4.2 จากเชื้อราทั้งหมดที่ได้ทำการคัดเลือก สามารถทำการเลี้ยงเชื้อในขนาดขยายได้ทั้งหมดจำนวน 18 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 9

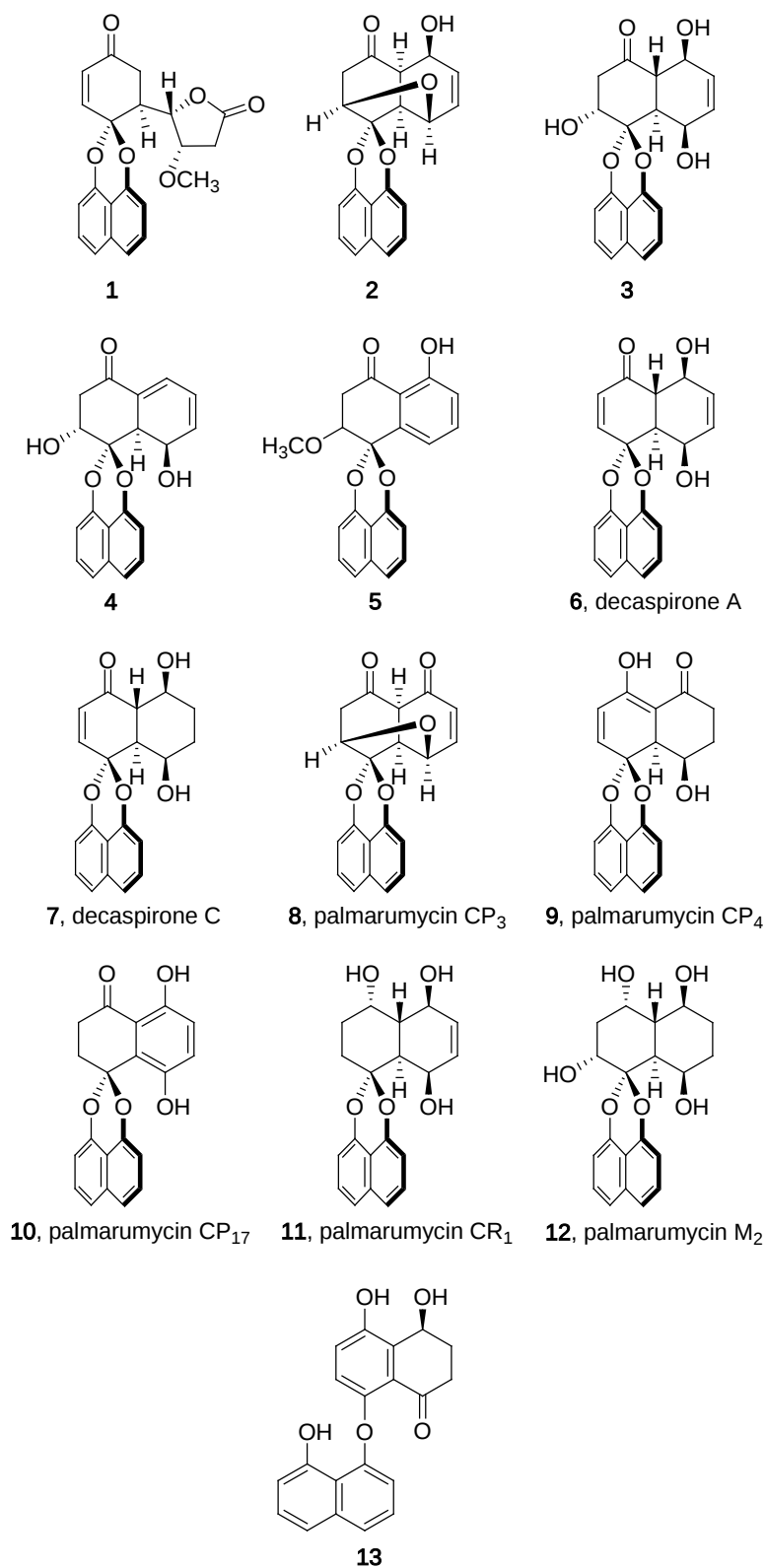
ตารางที่ 9. รายชื่อราทะเลที่เลี้ยงในขนาดขยาย (large scale fermentation)

No.	Original code	Scientific Name	Media	Condition	Volume
1	SAT00832	<i>Julella avicenniae</i>	PYGM	static	20 L
2	JS00240	<i>Periconia prolifica</i>	4G	static	20 L
3	SAT01364	<i>Platystomum scabridisporium</i>	MEB	static	20 L
4	SAT01366	<i>Tirisporella beccariana</i>	GlyPy	static	20 L
5	SPP27-1	<i>Astrosphaeriella nypae</i>	LCN	static	10 L
6	SAT00337	<i>Phaeosphaeria macrosporidium</i>	LS2	static	20 L
7	NBRC 30420	<i>Zopfiella marina</i>	4G	static	20 L
8	SAT00815	<i>Trematosphaeria mangrovis</i>	4G	static	20 L
9	GR00235	<i>Zalerion vari</i>	Bio27	static	20 L
10	MD01920	<i>Fusarium equiseti</i>	4G	static	10 L
11	MD00972	<i>Phomopsis</i> sp.	LL	static	20 L
12	MD01871	Unidentified fungus	PDB	static	10 L
13	MD00780	Unidentified fungus	PDB	static	20 L
14	JS1006	Unidentified fungus	Bio27	static	10 L
15	AK0101	<i>Trimmatostroma</i> sp.	LL	static	20 L
16	MCR00056	<i>Nemania maritima</i>	PDB	static	20 L
17	AK0093	<i>Halorosellinia oceanica</i>	PDB	static	15 L
18	MD01703	<i>Rhizopycnis</i> sp.	LL	shake	20 L

4.3 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี หาโครงสร้างของสารที่แยกได้และส่งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.3.1 เชื้อราทะเล BCC 25093 (KH00100) ซึ่งอยู่ใน order Pleosporales แยกจากไม้โกงกางที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติหาดขนอม-หมู่เกาะทะเลใต้ จ.สุราษฎร์ธานี ได้ถูกนำมาเลี้ยงใน production medium คือ potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 10 ลิตร ในสภาวะเขย่า เป็นเวลา 20 วัน หลังจากทำการสกัด และแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ได้สารทั้งหมด 13 ตัว ดังรูปที่ 2 โดยสารใหม่ คือสาร 1-5 ซึ่งให้ชื่อว่า palmarumycins P₁-P₅ พร้อมด้วยสาร known คือ

decaspirones A (6) และ C (7), palmarumycins CP3 (8), CP4 (9), CP17 (10), CR1 (11), และ M2 (12) รวมทั้งสาร diaryl ether (13)



รูปที่ 2. โครงสร้างของสารที่แยกได้จากเชื้อราทะเล BCC 25093 ซึ่งอยู่ใน order Pleosporales

ตารางที่ 10. แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารในกลุ่ม spirodioxynaphthalene ซึ่งแยกจากเชื้อราทะเล BCC 25093

Compound	<i>P. falciparum</i> (IC ₅₀ , µg/mL)	<i>M. tuberculosis</i> (MIC, µg/mL)	<i>B. cereus</i> (MIC, µg/mL)	Vero cell lines (IC ₅₀ , µg/mL)
1	2.36	1.56	25	0.79
2	>10	>50	>25	0.18
3	>10	12.5	>25	3.95
5	>10	>50	>25	>50
6	2.30	1.56	12.5	0.18
7	2.28	3.13	12.5	0.91
8	2.23	3.13	12.5	0.10
10	>10	>50	>25	>50
11	>10	12.5	>25	3.54
dihydroartemisinin ^a	0.0004	-	-	-
isoniazid ^b	-	0.023-0.047	-	-
vancomycin ^c	-	-	2.0	-
ellipticine ^d	-	-	-	1.79-2.43

^a Standard anti-malarial drug against *P. falciparum*.

^b Standard ant-tuberculosis drug against *M. tuberculosis*.

^c Standard anti-bacterial drug against *B. cereus*.

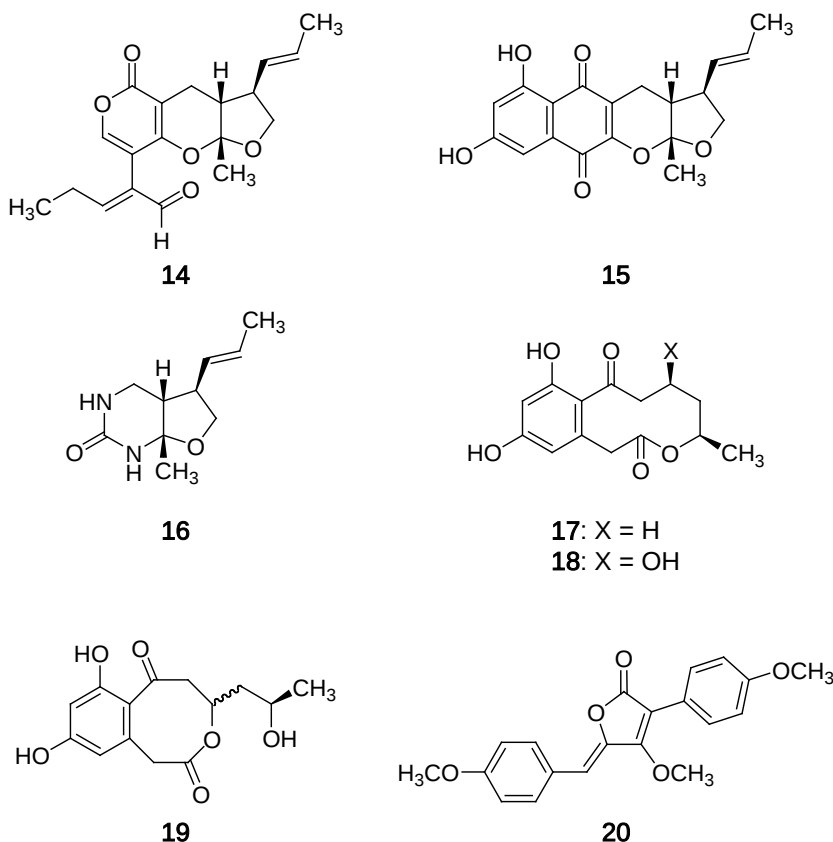
^d Standard compound for cytotoxicity assay against African green monkey kidney fibroblast (Vero) cells.

ผลทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร **1-3**, **5-8**, **10** และ **11** แสดงดังตารางที่ 10 สาร palmarumycin P₁ (**1**), decaspiroones A (**6**) และ C (**7**), และ palmarumycin CP3 (**8**) แสดงฤทธิ์ต้านมาลาเรียในระดับหลอดทดลองด้วยค่า IC₅₀ = 2.23-2.36 µg/mL และแสดงฤทธิ์ต้านวัณโรคในระดับหลอดทดลองด้วยค่า MIC = 1.56-3.13 µg/mL นอกจากนี้ยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ด้วยค่า IC₅₀ = 0.10-0.91 µg/mL สารทั้ง 4 ตัวมีหมู่ α,β-unsaturated ketone ที่เหมือนกัน ดังนั้นเป็นไปได้ว่า α,β-unsaturated ketone จะเป็น functional group ที่สำคัญซึ่งมีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารในกลุ่มนี้

โดยงานวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์ในหัวข้อเรื่อง “Palmarumycins from the mangrove fungus BCC 25093” ในวารสารนานาชาติ “Tetrahedron” ปี 2015 ฉบับที่ 71 หน้า 5572-5578

4.3.2 เชื้อราทะเล *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335 (SPP27-1) ซึ่งแยกได้จากต้นจาก (*Nypa fruticans*) จ. สมุทรปราการ ถูกนำมาเลี้ยงใน production medium ประกอบด้วย manitol 10 กรัม glucose 10 กรัม yeast extract 5 กรัม และ soytone 5.0 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ทำการบ่มในสภาวะไม่เขย่า เป็นเวลา 35 วัน ในปริมาตร 10 ลิตร หลังจากทำการสกัด สารสกัดหยาบที่ได้ถูก

นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 7 ตัว ดังรูปที่ 3 โดยสาร 14-16 เป็นสารที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน และให้ชื่อว่า astronyprone (14) astronyquinone (15) และ astronyurea (16) ส่วนสารที่เคยมีการรายงานแล้ว ได้แก่ xestodecalactone A และ B (17, 18), coryoctalactone (19) และ dimethoxy-O-methylpulvinone (20)



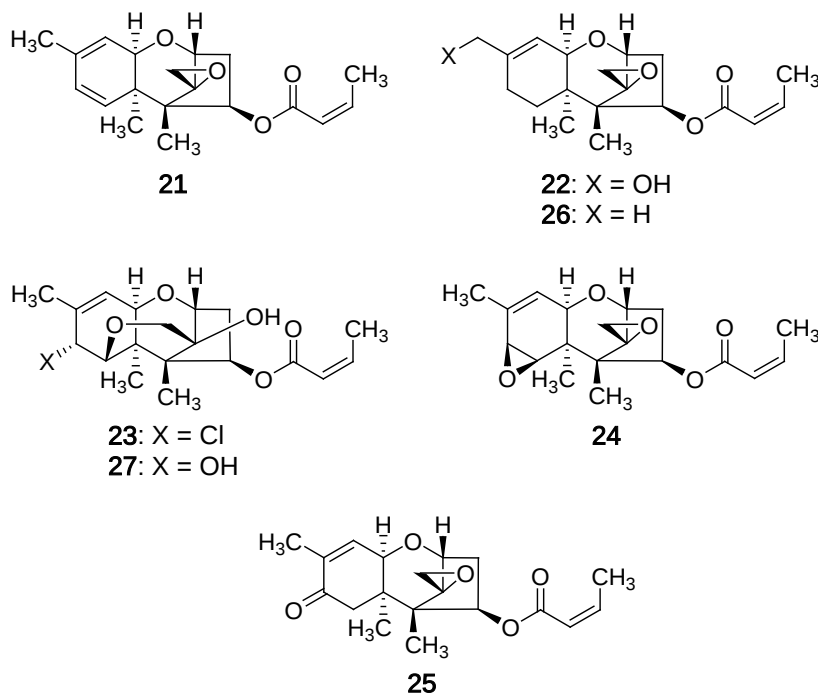
รูปที่ 3. โครงสร้างของสารที่แยกได้จากเชื้อราทะเล *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335 (SPP27-1)

ได้ทำการส่งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งรวมถึงฤทธิ์ต้านมาลาเรีย วัณโรค และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร 15, 17 และ 20 พบว่าสาร 20 แสดงฤทธิ์ต้านมาลาเรียในระดับหลอดทดลองต่อ *Plasmodium falciparum* K1 ด้วยค่า $IC_{50} = 5.7 \mu\text{g/mL}$ สาร 15 แสดงฤทธิ์ต้านวัณโรคในระดับหลอดทดลองต่อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ด้วยค่า MIC = 50 $\mu\text{g/mL}$ และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง (Vero cell lines) ด้วยค่า $IC_{50} = 17.4 \mu\text{g/mL}$ สาร 17 ไม่แสดงฤทธิ์ต้านมาลาเรียและวัณโรค ณ ความเข้มข้น 10 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

โดยงานวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์ในหัวข้อเรื่อง “A pyrone, naphthoquinone, and cyclic urea from the marine-derived fungus *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335” ในวารสารนานาชาติ “Tetrahedron Letters” ปี 2016 ฉบับที่ 57 หน้า 1171-1173

4.3.3 เชื้อราทะเล BCC 20012 (GR00235) แยกได้จากก้านใบของต้นจาก (*Nypa fruticans*) ซึ่งเก็บจากอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะช้าง จ.ตราด เชื้อ BCC 20012 ซึ่งก่อนหน้านี้ได้ถูกจัดจำแนกเป็น *Halenospora varia* ได้ถูกนำมายืนยันการจัดจำแนกโดยการสกัด DNA หลังจากการทำ DNA sequencing และวิเคราะห์ผลของ DNA sequence ด้วยวิธีทาง phylogeny พบว่าเชื้อ BCC 20012 มีผลการจัดจำแนกเป็น *Acremonium crotoicinigenum* เมื่อนำเชื้อ BCC 20012 มาเลี้ยง โดยมี production medium ซึ่งประกอบด้วย glucose 10 g, corn steep solid 10 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ในสภาวะไม่เขย่า เป็นเวลา 34 วัน เป็นปริมาตร 20 L หลังจากทำการสกัด สารสกัดหยาบที่ได้ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ได้สารบริสุทธิ์จำนวน 7 ตัว ดังรูปที่ 4 โดยสาร 21-23 เป็นสารใหม่ ส่วนสาร 24-27 เป็นสารที่เคยมีการรายงานมาแล้ว คือ crotoicin (24), trichothecin (25), 8-deoxytrichothecinol B (26), และอนุพันธ์ของ trichothecene (27)

ได้ทำการส่งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 21, 24, 25 และ 27 โดยผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 11 สาร 21 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียในระดับหลอดทดลองต่อ *Plasmodium falciparum* K1 ด้วยค่า $\text{IC}_{50} = 3.28 \mu\text{g/mL}$ และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง (Vero cell lines) ด้วยค่า $\text{IC}_{50} = 11.37 \mu\text{g/mL}$ สำหรับสารที่ส่งทดสอบ สารที่เคยมีการรายงาน คือ trichothecin (25) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียดังค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุด คือ $0.05 \mu\text{g/mL}$ และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง (Vero cell lines) ด้วยค่า $\text{IC}_{50} = 0.13 \mu\text{g/mL}$



รูปที่ 4. โครงสร้างของสาร trichothecenes ที่แยกได้จากเชื้อรา *Acremonium crotoicinigenum* BCC 20012

ตารางที่ 11. แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้จากเชื้อรา *Acremonium crotochinigenum* BCC 20012

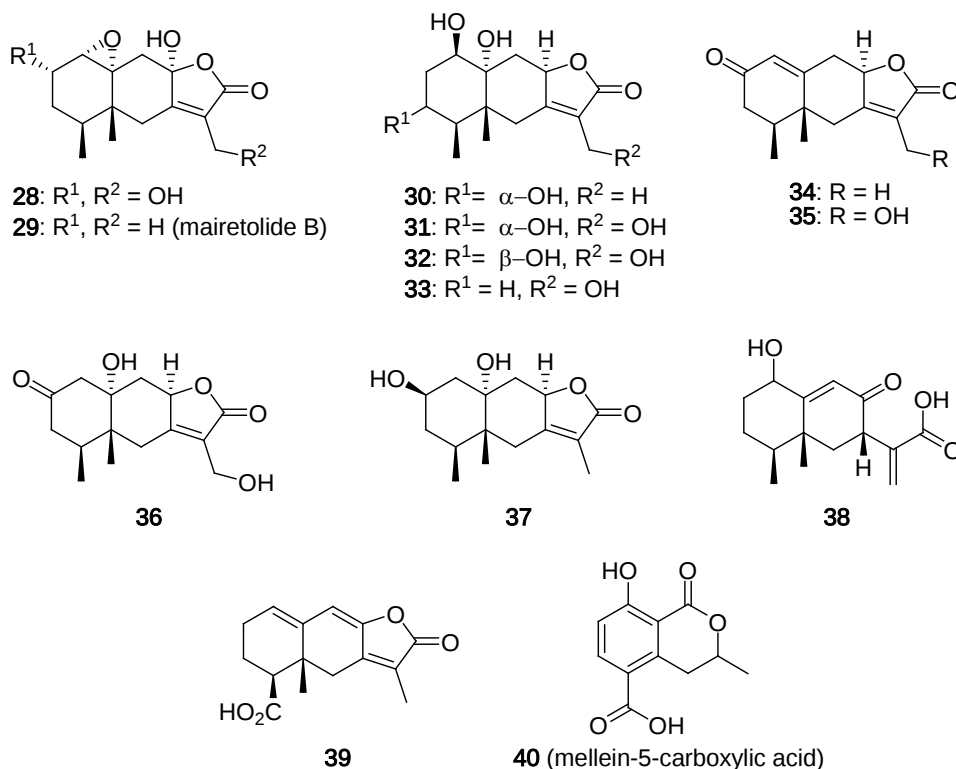
Compound	<i>P. falciparum</i> (IC ₅₀ , µg/ml)	Vero cell lines (IC ₅₀ , µg/ml)
21	3.28	11.37
24	0.26	0.58
25	0.05	0.13
27	>10	>50
dihydroartemisinin ^a	0.0004	-
ellipticine ^b	-	1.50—1.60

^a Standard antimalarial drug against *P. falciparum*.

^b Standard compound for cytotoxicity assay against African green monkey kidney fibroblast (Vero) cells.

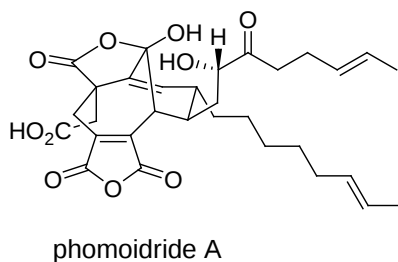
โดยงานวิจัยนี้ได้ส่งไปตีพิมพ์ในหัวข้อเรื่อง “Trichothecenes from the Fungus *Acremonium crotochinigenum* BCC 20012” ในวารสารนานาชาติ “Phytochemistry Letters” ปี 2016 ฉบับที่ 18 หน้า 39-43

4.3.4 เชื้อรา *Nemania maritima* (MCR00056) ซึ่งแยกได้จากซากกิ่งไม้หรือเศษไม้ ณ เกาะหัวตา จิว จ. ตรัง ถูกนำมาเลี้ยงโดยมี production medium คือ potato dextrose broth (PDB) ทำการบ่มในสภาวะไม่เขย่า เป็นเวลา 35 วัน ในปริมาตร 20 ลิตร ซึ่งก่อนหน้านี้นี้ได้เคยรายงาน (ในรอบ 24 เดือน) ว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 10 ตัว หลังจากทำการแยกสารเพิ่มเติมและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยใช้ข้อมูลจาก 1D (¹H and ¹³C) และ 2D NMR (NOESY, COSY, HMQC, HMBC) Spectroscopy และ Mass spectrometry พบว่าสารส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม eremophilane โดยได้สารใหม่ 9 ตัว และสารที่เคยมีการรายงานแล้ว 4 ตัว ได้แก่ สาร **29**, **33**, **39** และ **40** ดังรูปที่ 5 สำหรับ relative stereochemistry ของสารบางตัวอาจต้องได้รับการยืนยันโดย NOESY หรือ NOE difference experiment สาร 11 ตัวในจำนวนนี้ได้ถูกส่งไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่สารทั้งหมดไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum* K1) และเชื้อแบคทีเรีย (*Bacillus cereus* และ *Enterococcus faecium*) ณ ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดสอบ



รูปที่ 5. โครงสร้างของสารที่แยกได้จากเชื้อรา *Nemanium maritima* (MCR00056)

4.3.5 เชื้อรา *Platystomum scabridisporium* (SAT01364) แยกได้จากไม้ที่แทรกตัวอยู่ในบริเวณเนินทราย ณ The Mornington Peninsula National Park ประเทศออสเตรเลีย ถูกนำมาเลี้ยงโดยมี production medium ประกอบด้วย malt extract 6 g, maltose 1.8 g, dextrose 6 g, yeast extract 1.2 g ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ทำการบ่มในสภาวะไม่เขย่า เป็นเวลา 30 วัน ในปริมาตร 20 ลิตร ซึ่งในรายงานฉบับก่อนหน้า (รอบ 24 เดือน) ได้มีการรายงานว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 6 ตัว จากข้อมูลจาก 1D (1H และ ^{13}C) NMR, 2D NMR (NOESY, COSY, HMQC และ HMBC) spectroscopy และ Mass spectrometry พบว่าหนึ่งในสารที่แยกได้ เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว คือ phomoidride A ส่วนสารตัวอื่น ๆ น่าจะเป็นอนุพันธ์ของ phomoidride A แต่เนื่องจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มีความไม่เสถียร เมื่อนำมาบันทึก 1H NMR spectra อีกครั้ง พบว่า 1H NMR spectra เปลี่ยนไปจากเดิม ดังนั้นจึงทำการเลี้ยงเชื้อในขนาดขยายใหม่อีกครั้ง เพื่อนำสารสกัดที่ได้มาแยกสารให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป



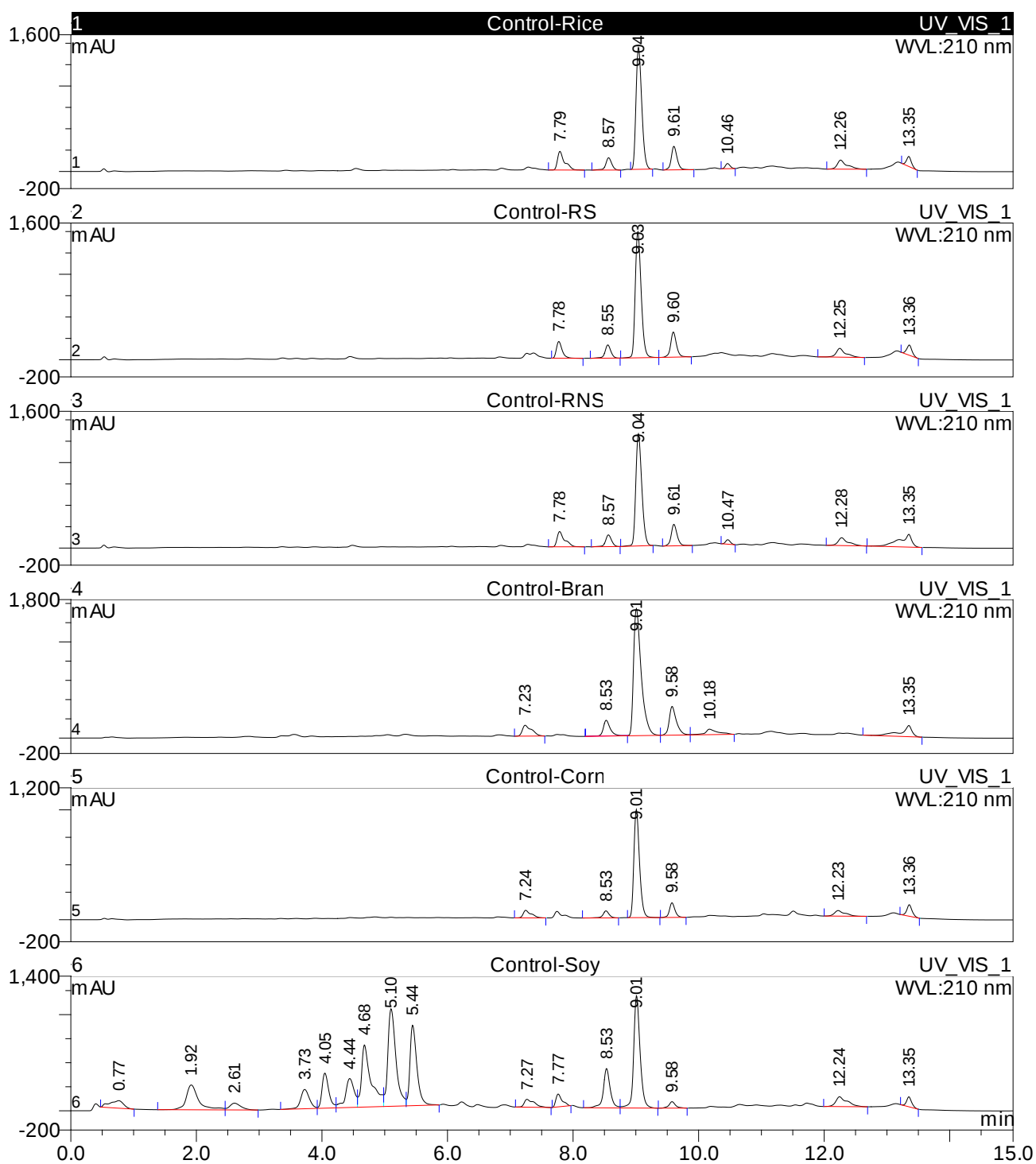
รูปที่ 6. โครงสร้างของ phomoidride A ที่แยกได้จากเชื้อรา *Platystomum scabridisporium*

4.4 การปรับเปลี่ยนอาหาร สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ และเปรียบเทียบการสร้างสารเมตาบอไลต์ โดย การวิเคราะห์สารสกัดด้วย HPLC

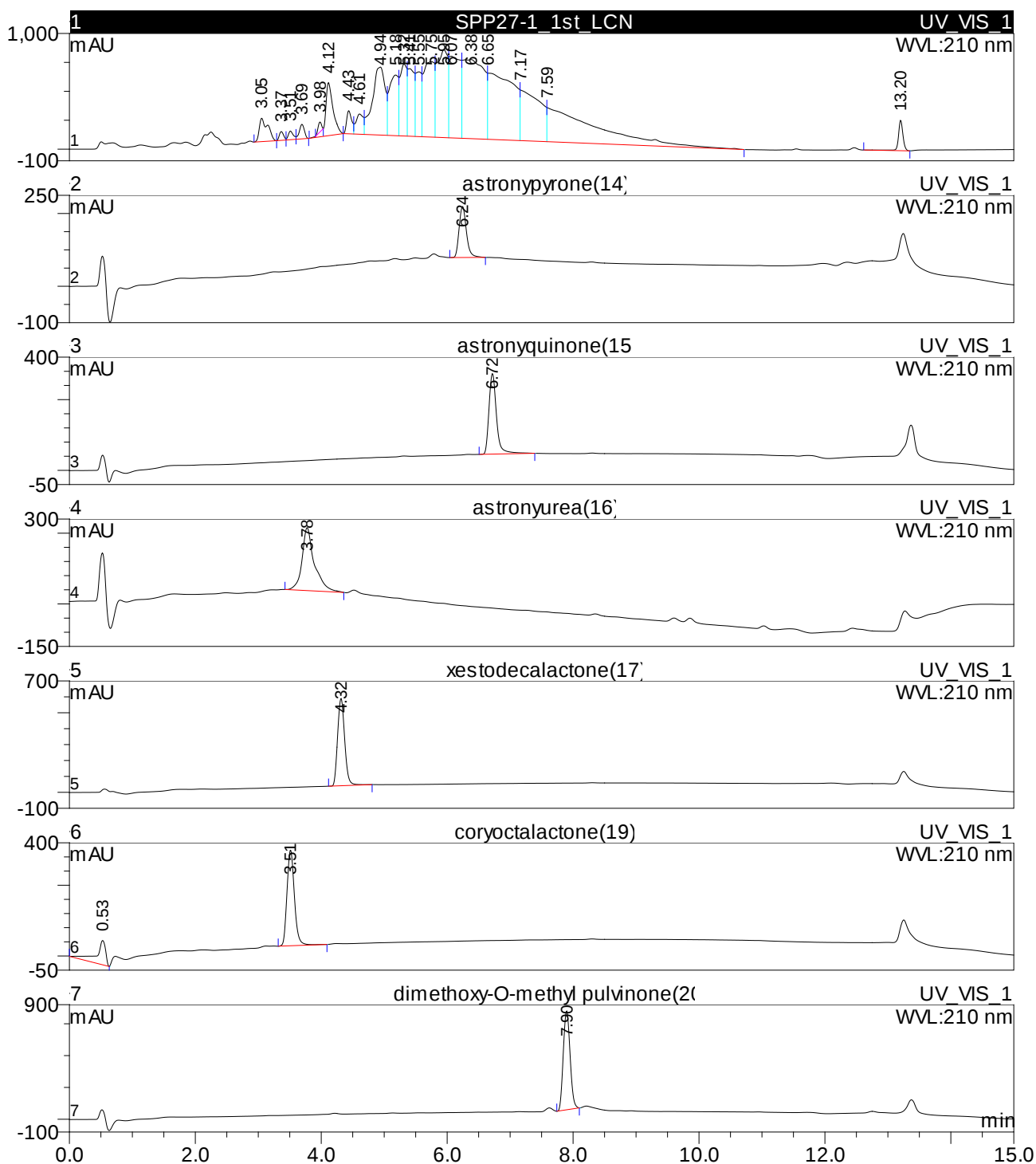
จากการเลือกเชื้อรา 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 1. เชื้อ *Trimmatostroma* sp. (AK0101) 2. เชื้อ *Astrosphaeriella nypae* (SPP27-1) และ 3. เชื้อ *Platystomum scabridisporium* (SAT01364) มาเลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารแข็งทั้งหมด 20 ชนิด (รายละเอียดดังข้อ 3.5) ได้สารสกัดในแต่ละอาหารดั่งน้ำหนักตามตารางที่ 12 หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้ผลดังรูปที่ 7-27

ตารางที่ 12. แสดงน้ำหนักสารสกัดจากการปรับเปลี่ยนอาหาร สภาวะในการเลี้ยงเชื้อเทียบกับสารสกัดจากการเลี้ยงครั้งแรกในขั้นตอนการเลือก (1st screening)

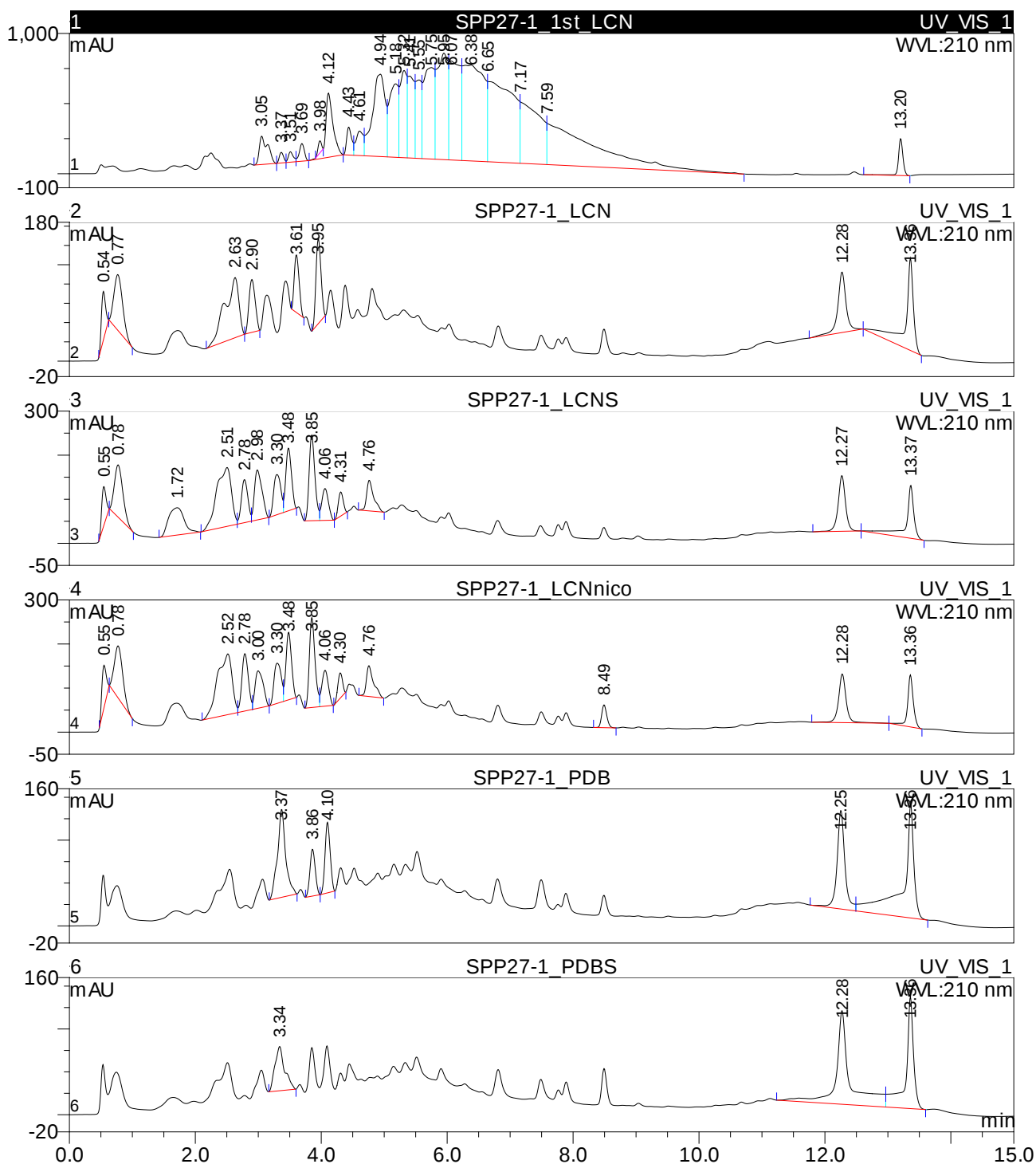
อาหาร	น้ำหนักสารสกัด (mg)			
	control	SPP27-1	AK0101	SAT01364
LCN (1 st screening)	-	14.1	-	-
LCN	-	1.5	-	-
LCNS	-	0.9	-	-
LCNnico	-	0.9	-	-
LL (1 st screening)	-	-	7.3	-
LL	-	-	4.3	-
LLS	-	-	4.7	-
LLnico	-	-	7.8	-
MEB (1 st screening)	-	-	-	1.9
MEB	-	-	-	0.5
MEBS	-	-	-	0.8
MEBnico	-	-	-	0.9
MEB_pH5	-	-	-	0.8
MEB_pH8	-	-	-	0.7
PDB	-	1	0.9	0.4
PDBS	-	0.7	0.8	0.5
Jackson	-	0.7	1	1.1
Tekeuchi	-	0.4	0.9	0.4
Czp malt	-	1.7	0.2	0.5
SDB	-	1.6	2	1.5
YOS	-	0.7	0.6	1
YESD	-	2.1	2.3	1.6
GMixN	-	0.7	0.8	1
MMixN	-	1	1.8	1.6
GMV	-	0.4	0.7	0.4
Rice	34.9	35	25.5	24.9
RiceS	26.3	20.6	45.3	33
RiceNS	30	19.2	43.5	22.2
Bran	257.2	291.9	244.4	30.7
Corn	64.1	49.9	226.3	81.1
Soy	41.1	29.7	18.8	83.5



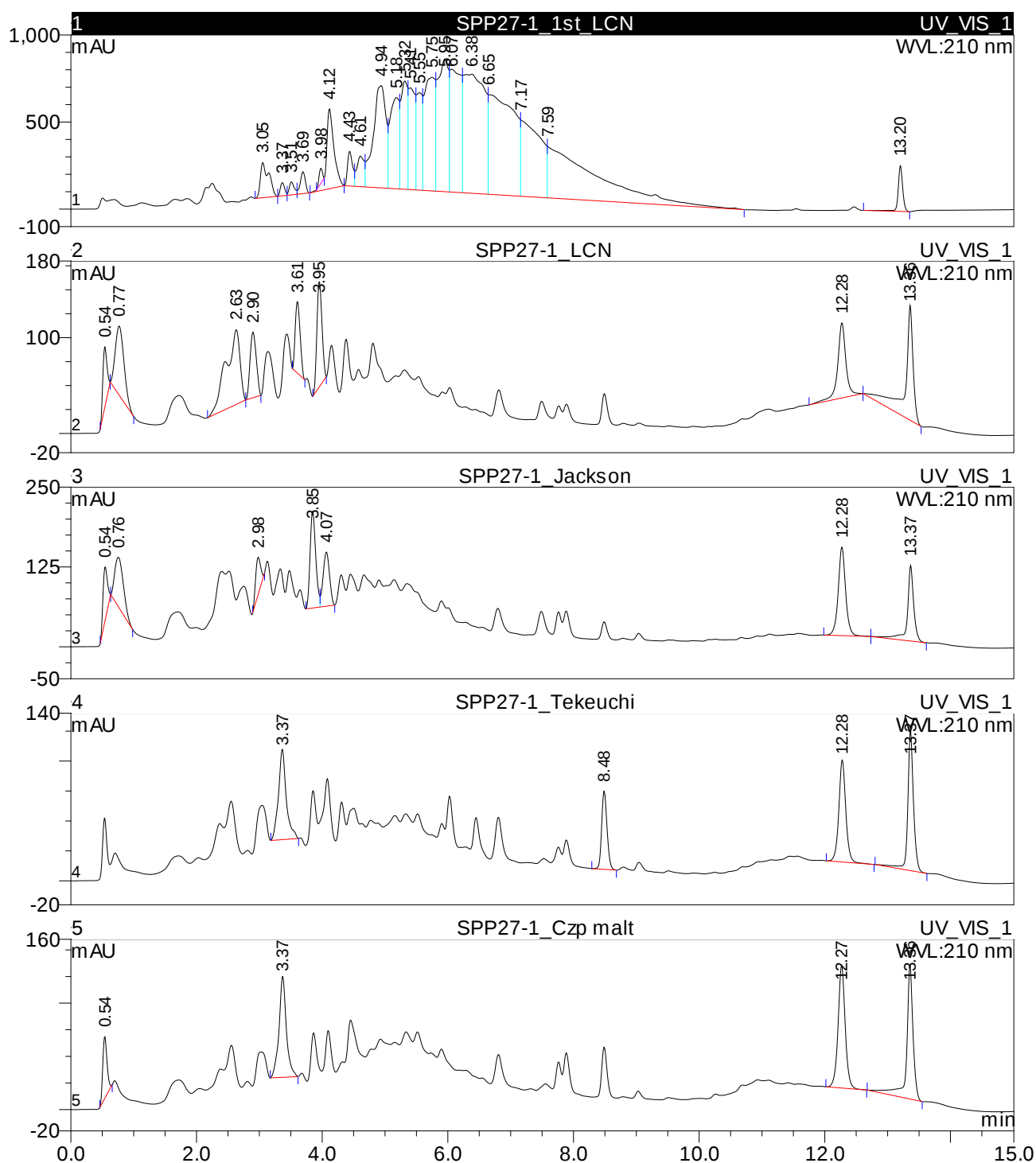
รูปที่ 7. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากอาหารแข็งเป่ล่า ๆ เพื่อใช้เปรียบเทียบ



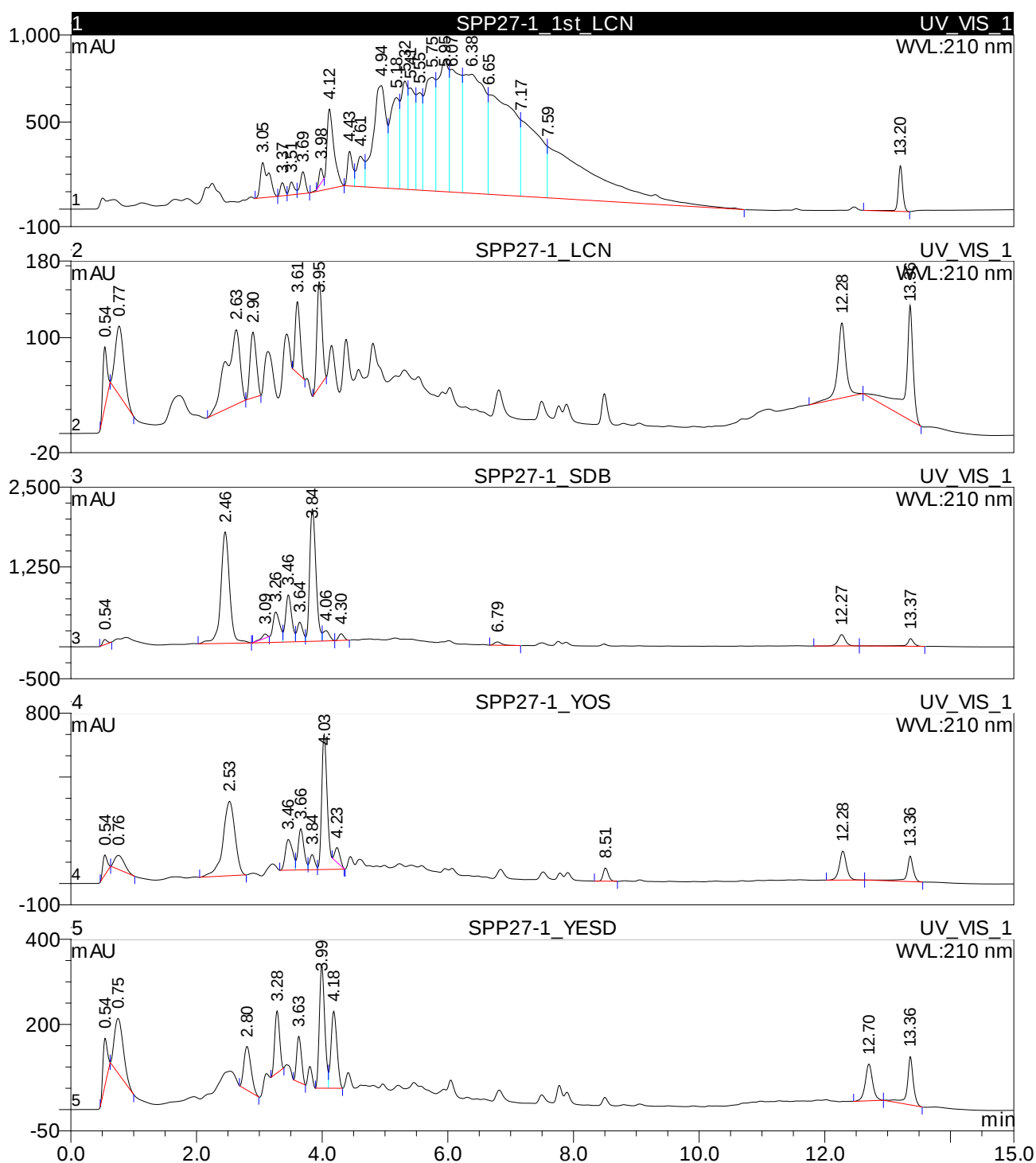
รูปที่ 8. HPLC chromatogram ของสารสกัดจาก small scale fermentation ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) เปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเชื้อรา *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335 (SPP27-1) ซึ่งประกอบด้วยสาร astronypyrone (14), astronyquinone (15), astronyurea (16), xestodecalactone (17), coryoctalactone (19) และ dimethoxy-O-methyl pulvinone (20).



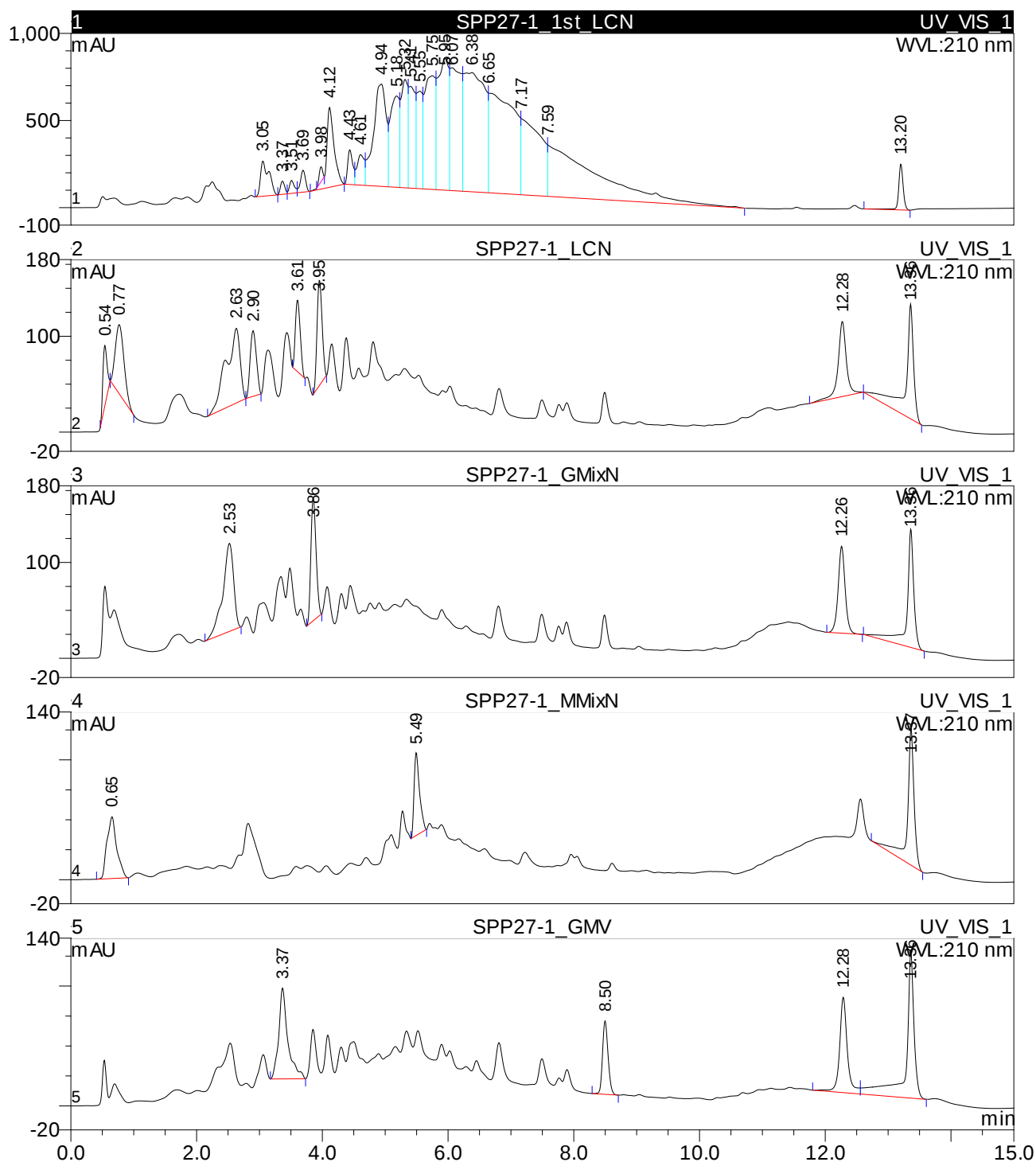
รูปที่ 9. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335 (SPP27-1) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร LCN ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร LCN ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสถานะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) อาหาร LCNS, (4) อาหาร LCNnico, (5) อาหาร PDB, (6) อาหาร PDBS (รูปล่างสุด).



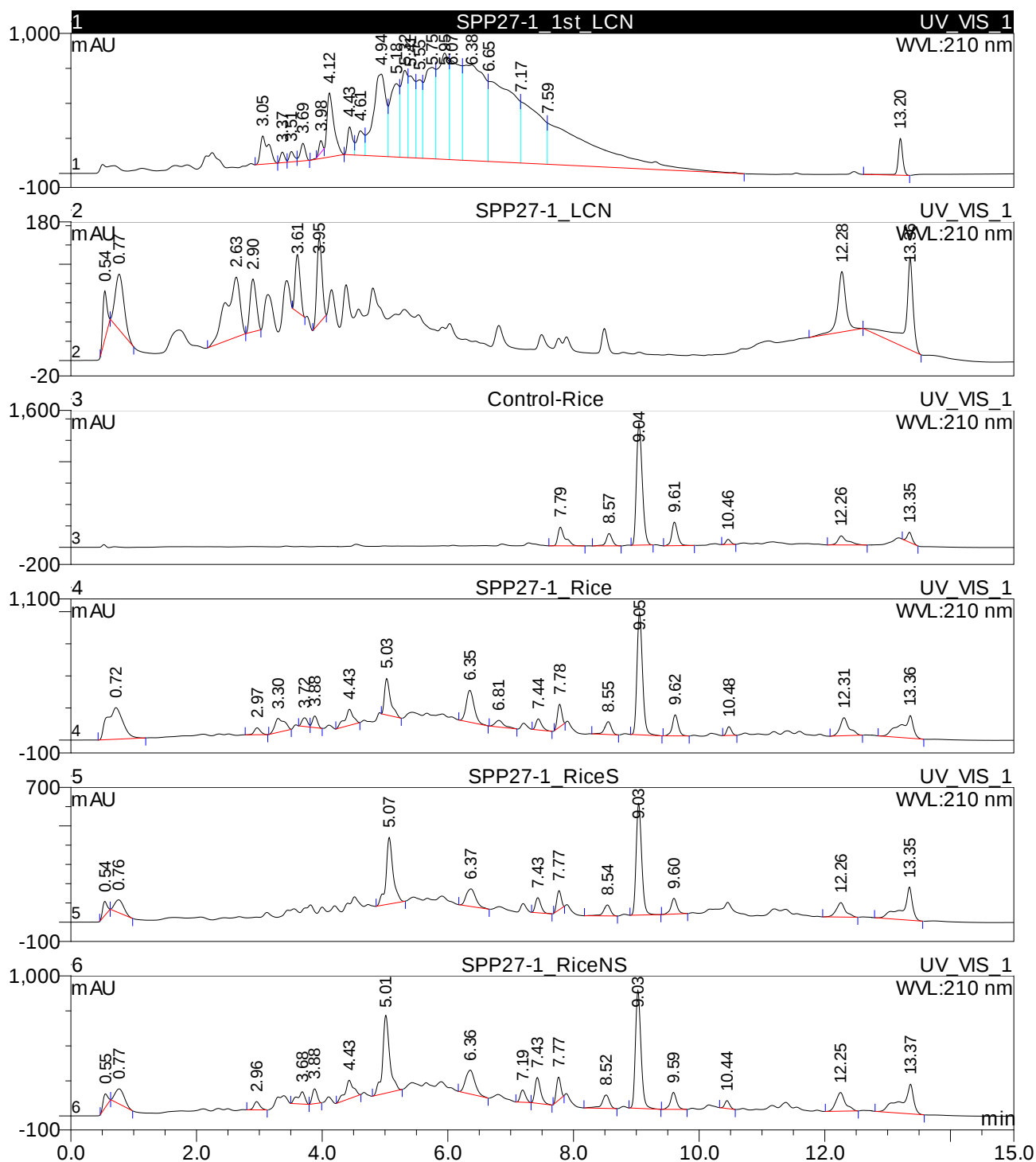
รูปที่ 10. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335 (SPP27-1) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร LCN ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร LCN ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) อาหาร Jackson, (4) อาหาร Tekeuchi, (5) อาหาร Cpz malt (รูปล่างสุด).



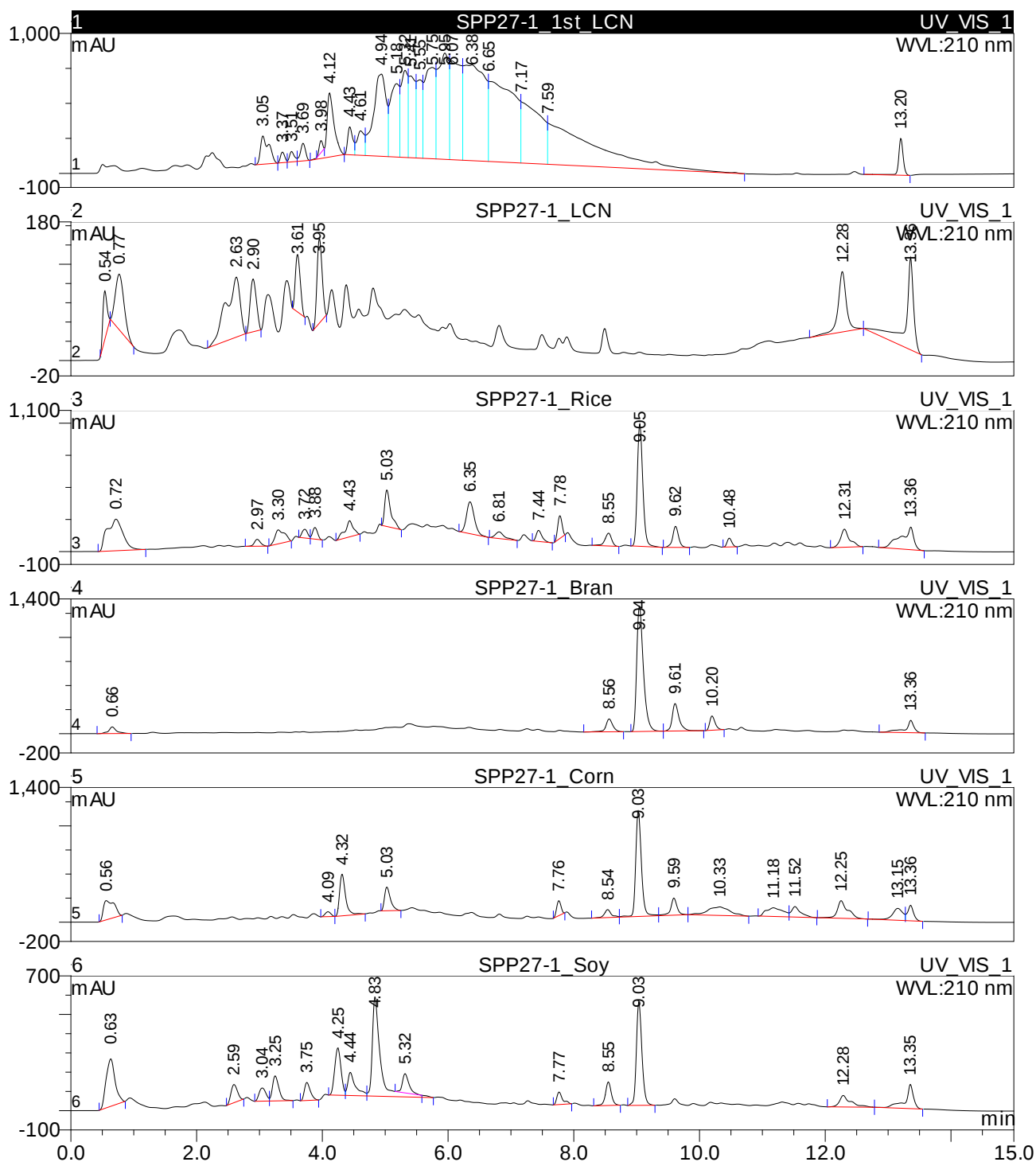
รูปที่ 11. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335 (SPP27-1) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร LCN ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร LCN ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) อาหาร SDB, (4) อาหาร YOS, (5) อาหาร YESD (รูปล่างสุด).



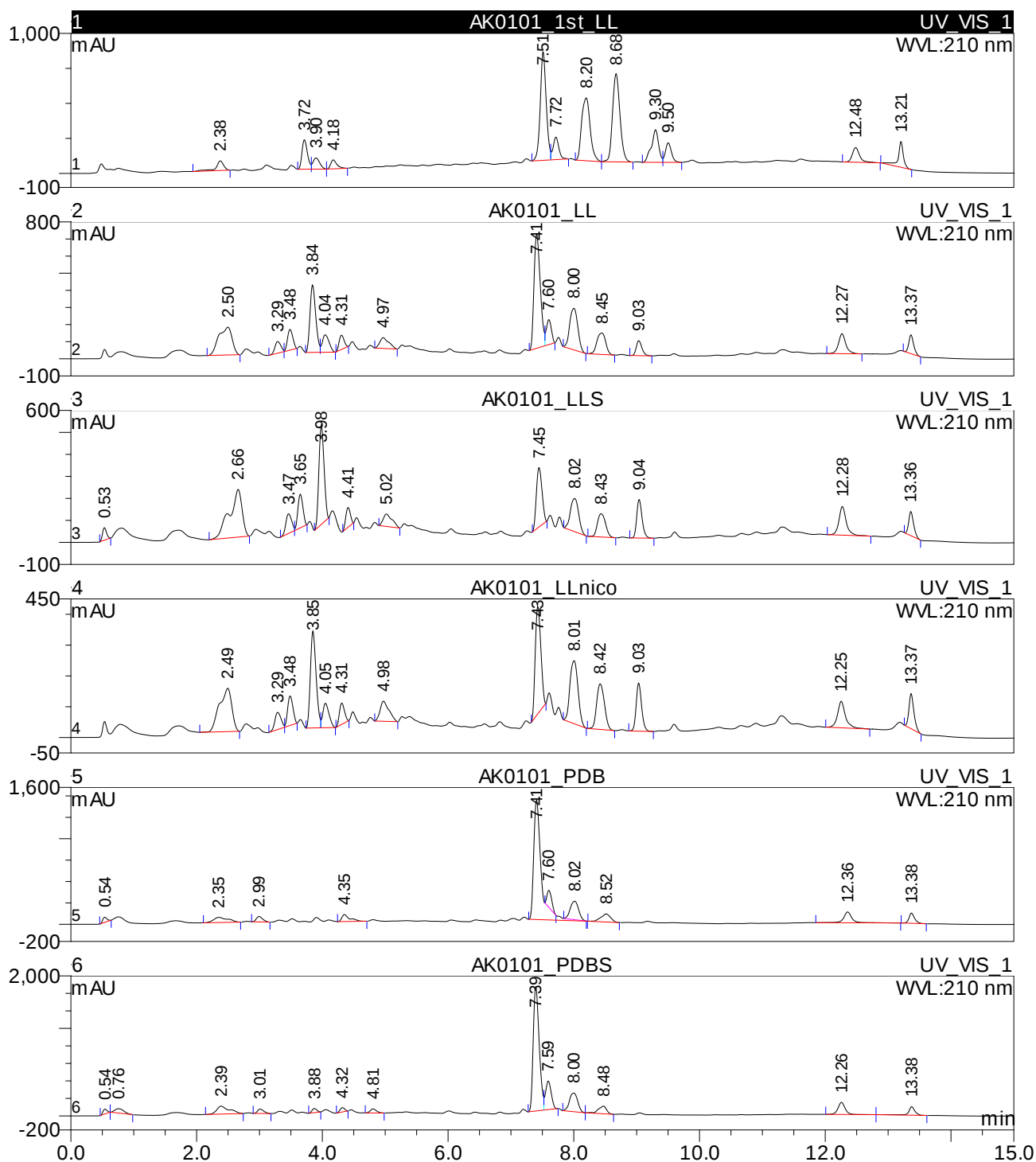
รูปที่ 12. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335 (SPP27-1) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร LCN ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร LCN ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) อาหาร GMixN, (4) อาหาร MMixN, (5) อาหาร GMV (รูปล่างสุด).



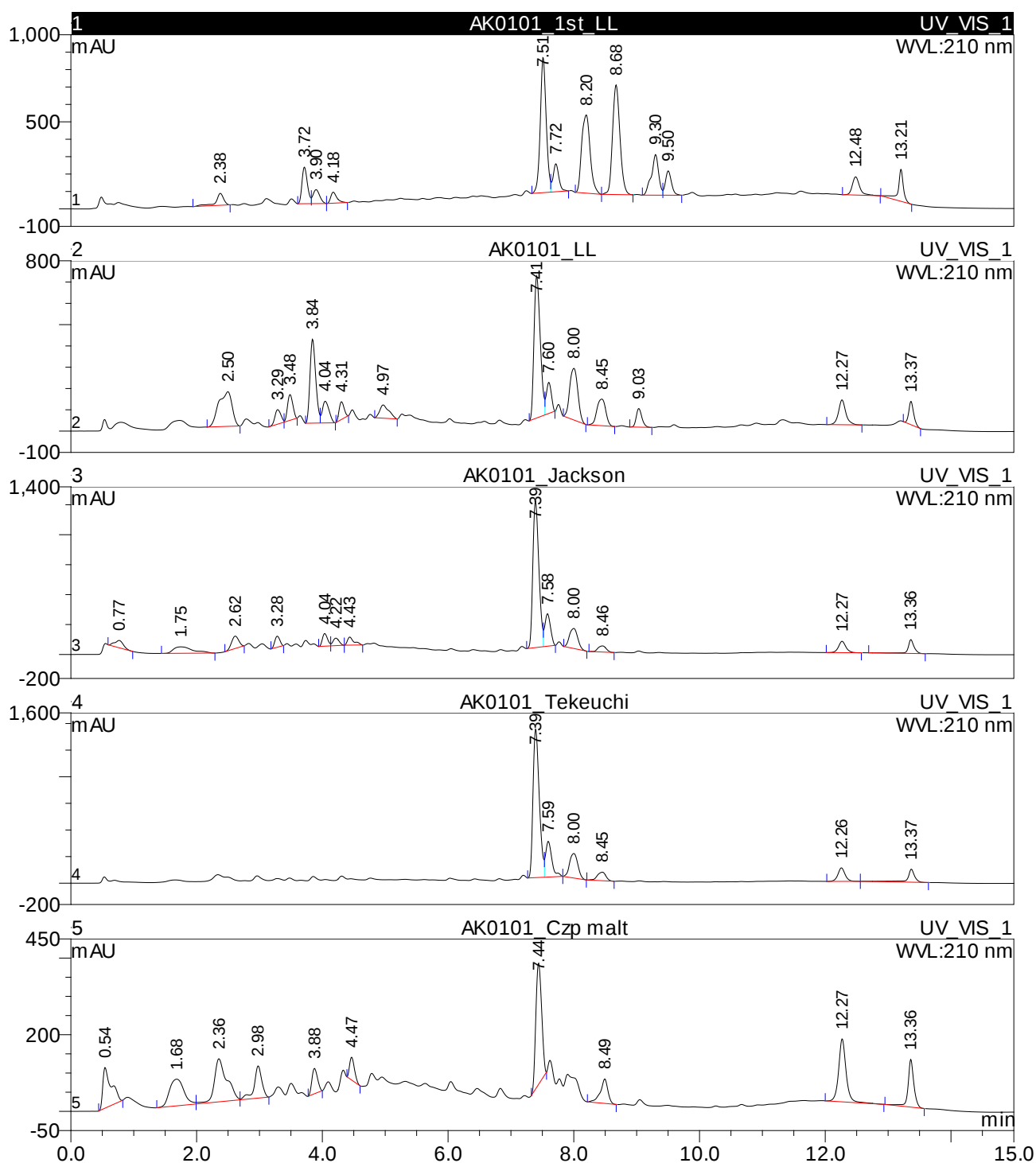
รูปที่ 13. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335 (SPP27-1) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร LCN ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร LCN ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (4) Rice, (5) RiceS, (6) RiceNS (รูปล่างสุด) เปรียบเทียบกับ (3) Control-Rice (ข้าวเปล่า ๆ ที่ไม่มีการเติมเชื้อลงไป).



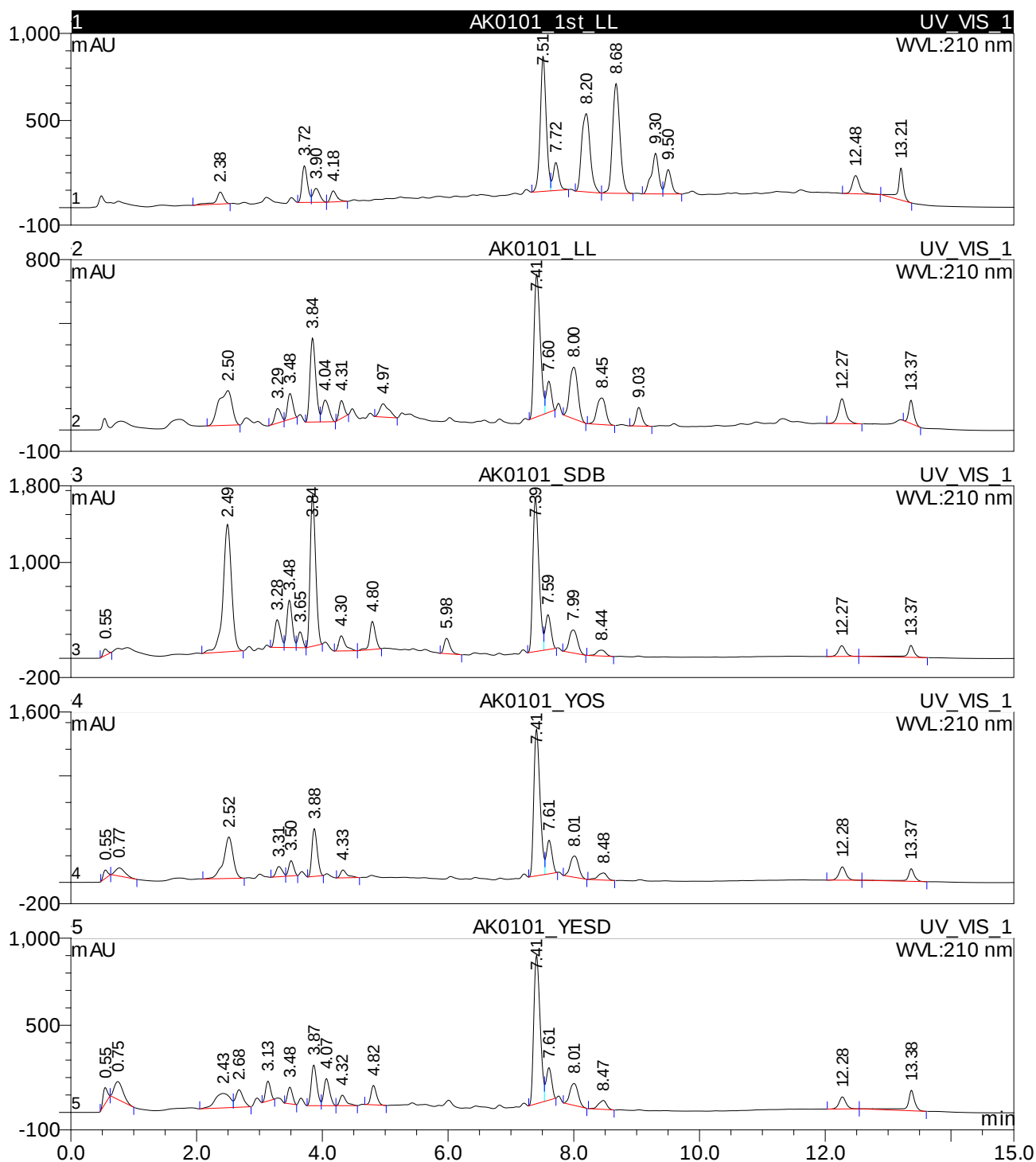
รูปที่ 14. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335 (SPP27-1) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร LCN ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร LCN ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) Rice, (4) Bran, (5) Corn, (6) Soy (รูปล่างสุด).



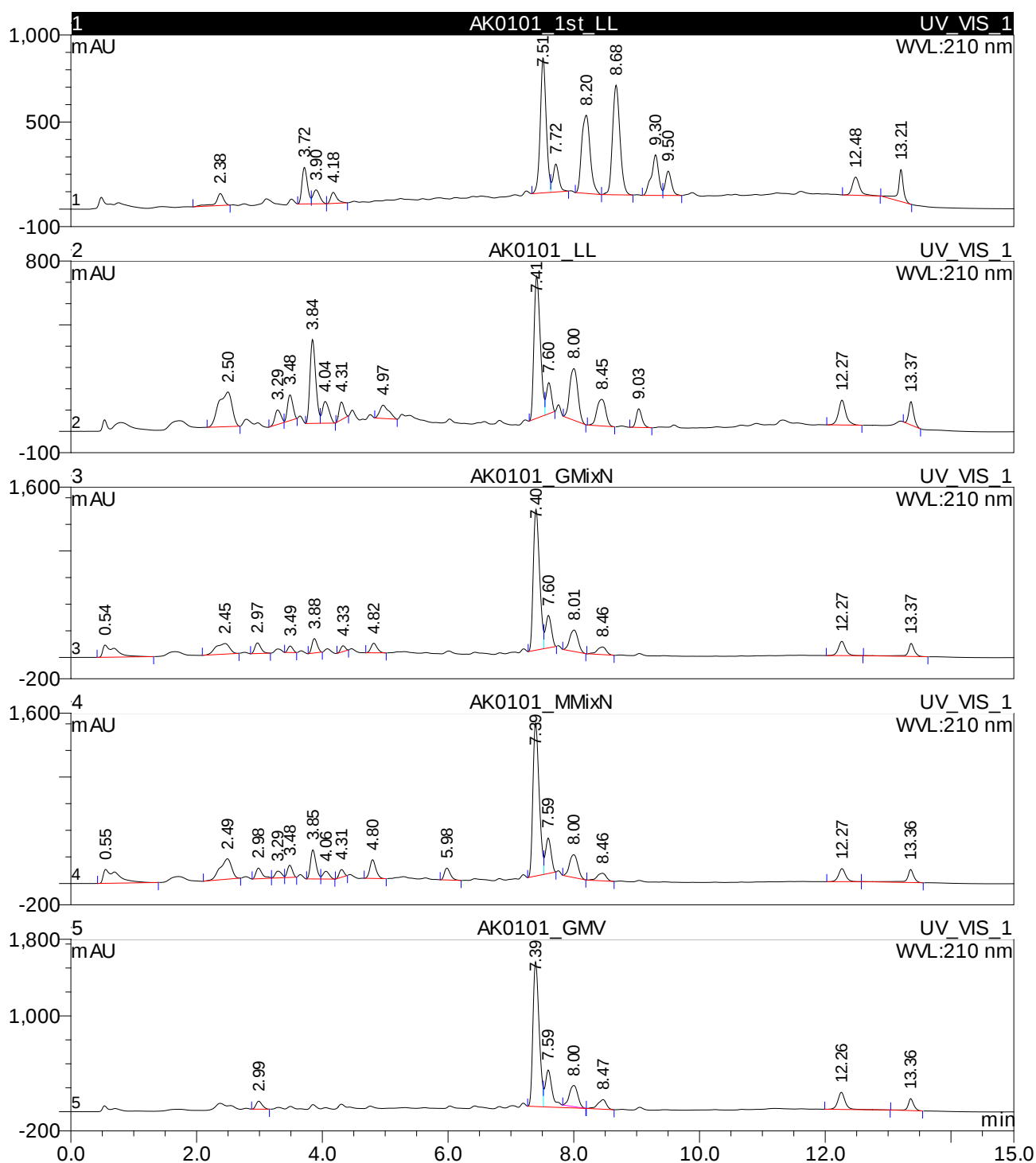
รูปที่ 15. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Trimmatostroma* sp. (AK0101) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร LL ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร LL ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) อาหาร LLS, (4) อาหาร LLnico, (5) อาหาร PDB, (6) อาหาร PDBS (รูปล่างสุด).



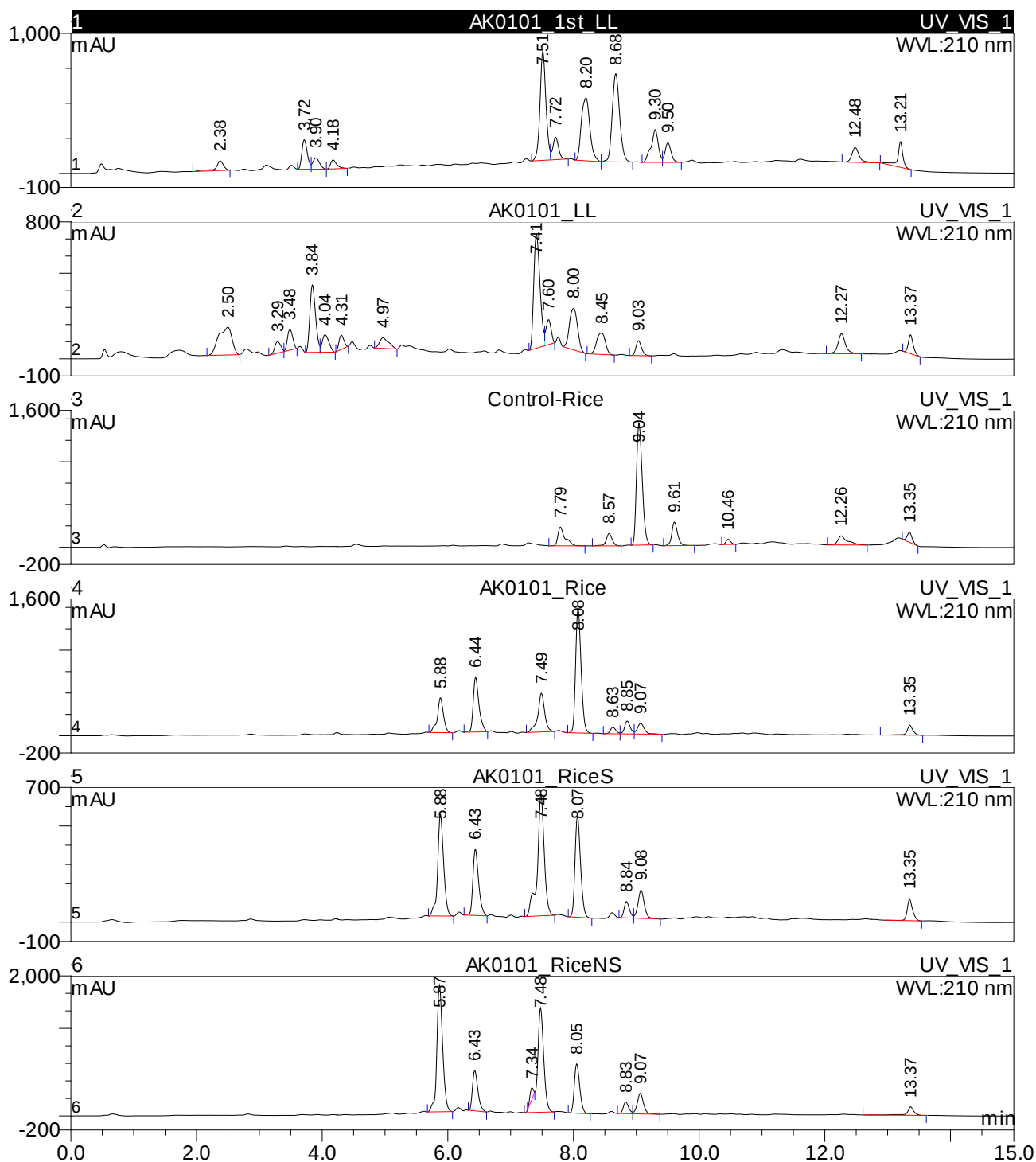
รูปที่ 16. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Trimmatostroma* sp. (AK0101) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร LL ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร LL ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) อาหาร Jackson, (4) อาหาร Tekeuchi, (5) อาหาร Czp malt (รูปล่างสุด).



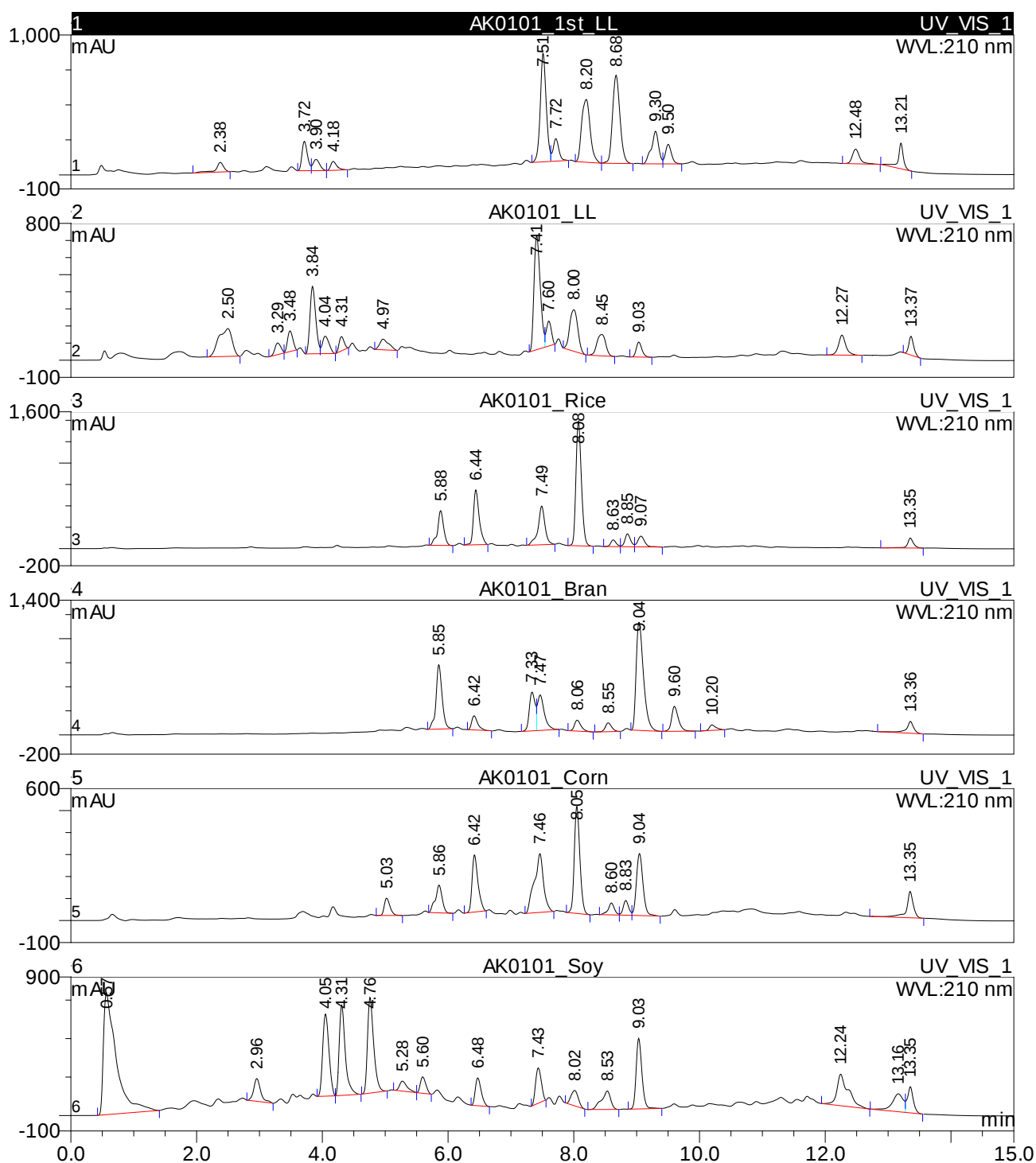
รูปที่ 17. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Trimmatostronga* sp. (AK0101) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร LL ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร LL ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) อาหาร SDB, (4) อาหาร YOS, (5) อาหาร YESD (รูปล่างสุด).



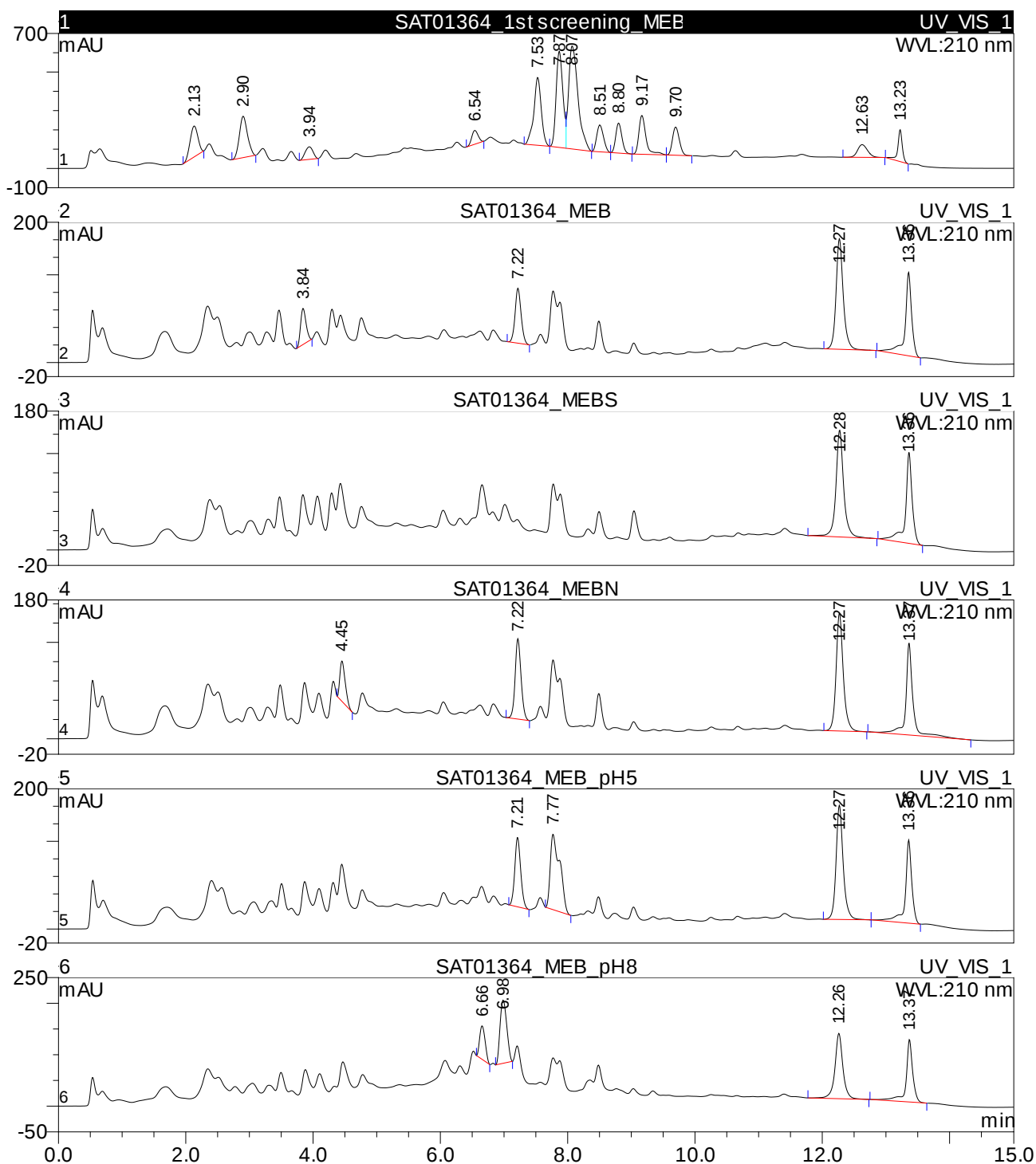
รูปที่ 18. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Trimmatostroma* sp. (AK0101) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร LL ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร LL ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อให้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) อาหาร GMixN, (4) อาหาร MMixN, (5) อาหาร GMV (รูปล่างสุด).



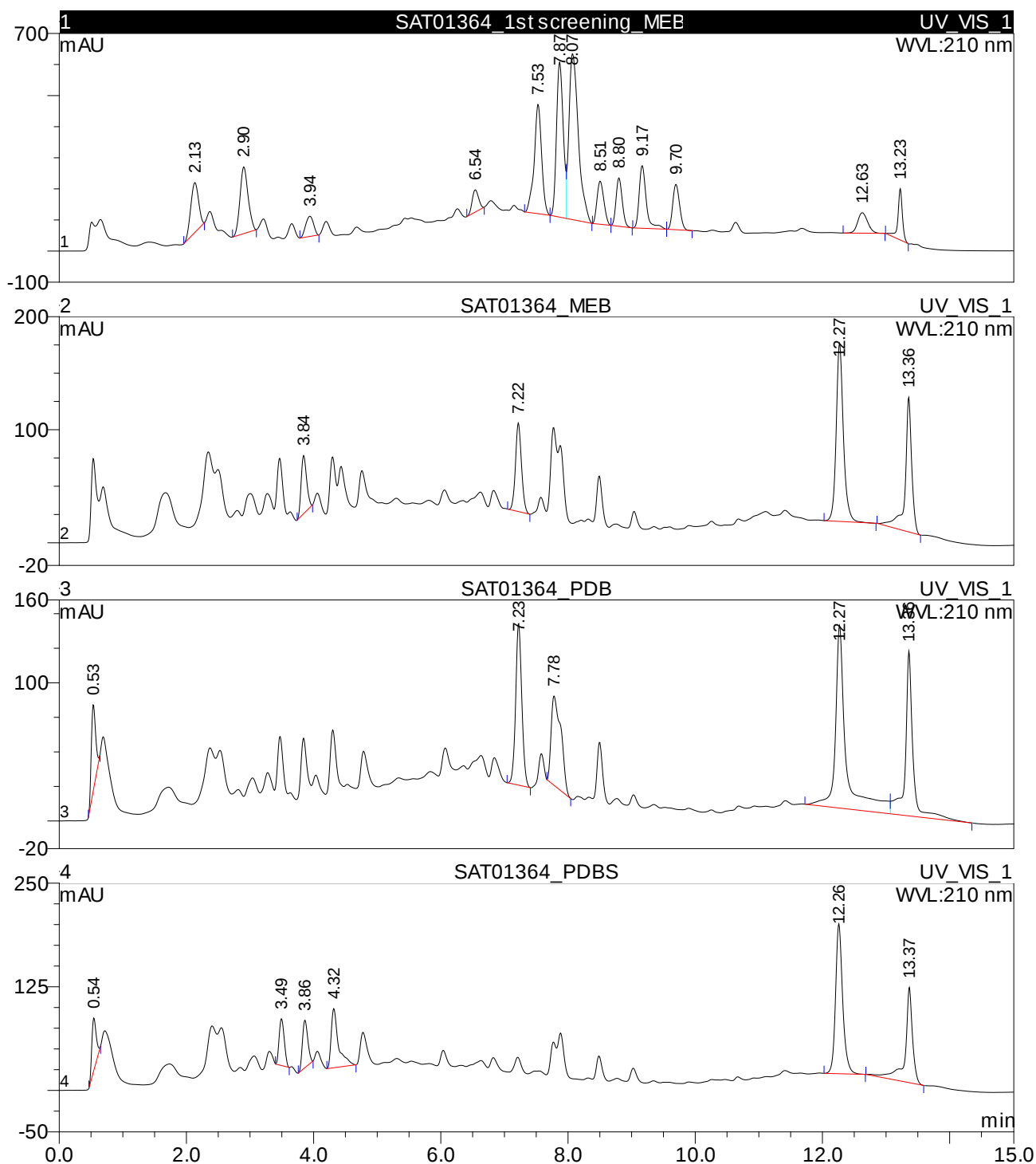
รูปที่ 19. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Trimmatostronga* sp. (AK0101) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร LL ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร LL ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (4) Rice, (5) RiceS, (6) RiceNS (รูปล่างสุด) เปรียบเทียบกับ (3) Control-Rice (ข้าวเปล่า ๆ ที่ไม่มีการเติมเชื้อลงไป).



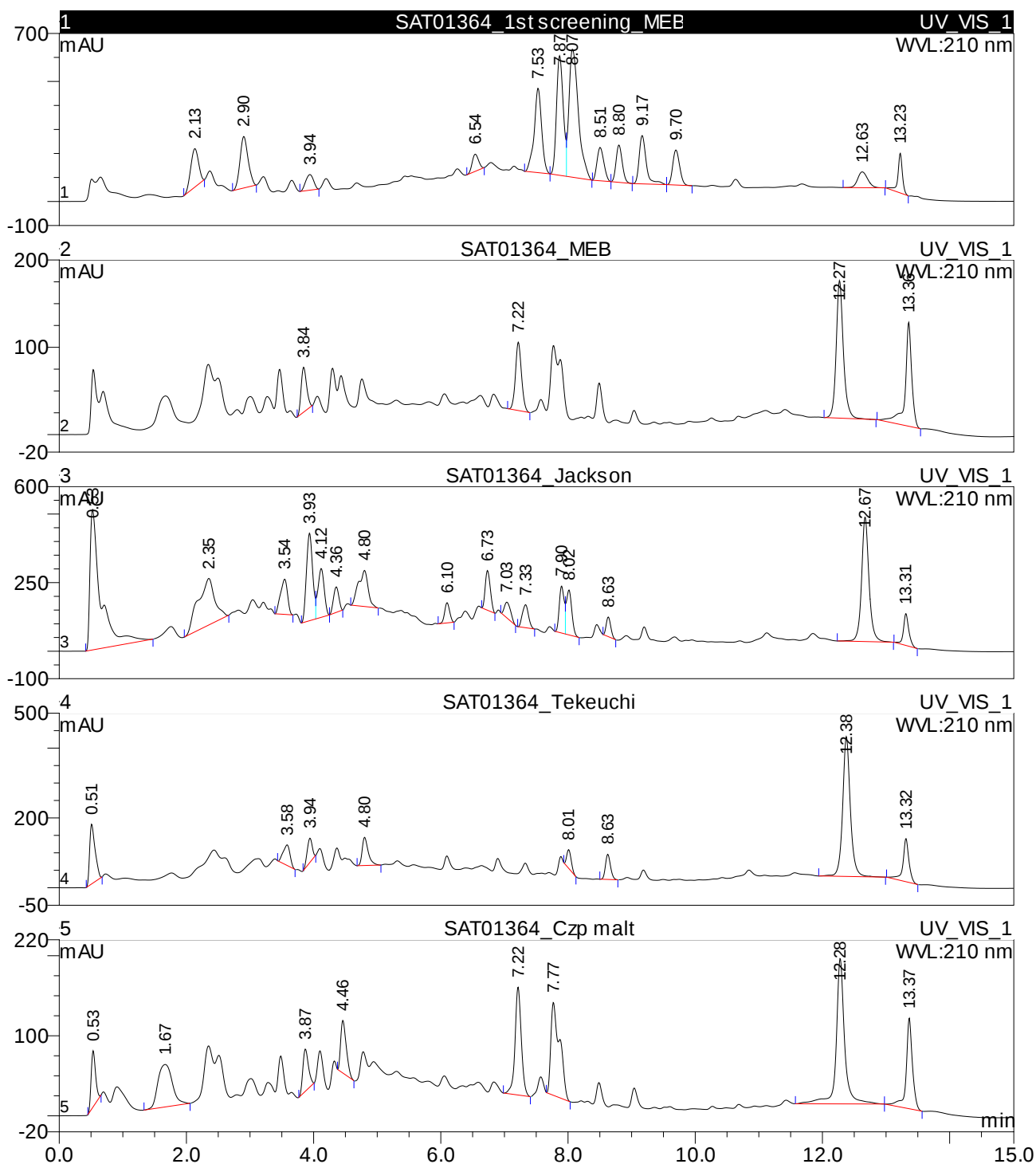
รูปที่ 20. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Trimmatostrongia* sp. (AK0101) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร LL ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร LL ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อให้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) Rice, (4) Bran, (5) Corn, (6) Soy (รูปล่างสุด).



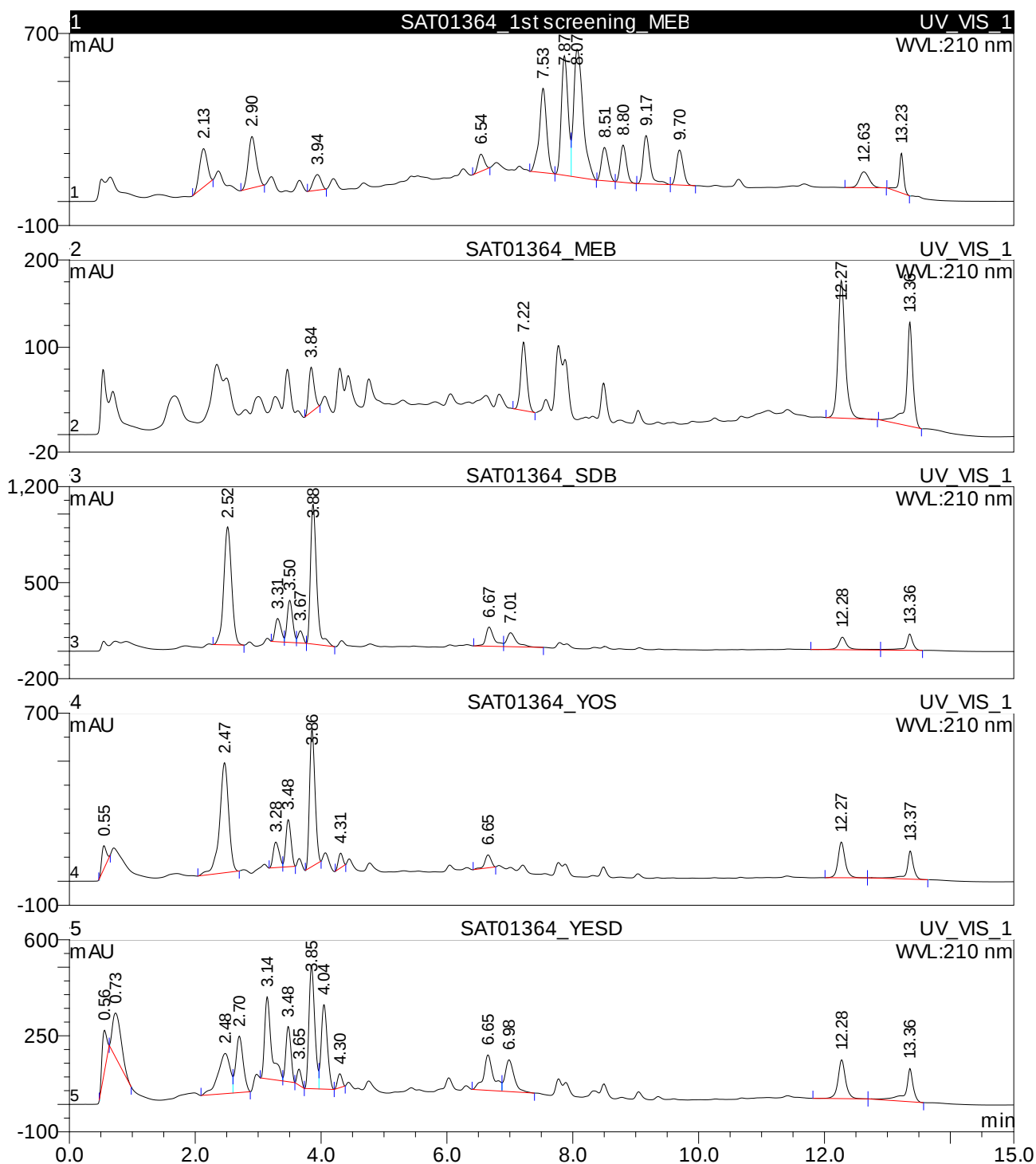
รูปที่ 21. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Platystomum scabridisporium* (SAT01364) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร MEB ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร MEB ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) อาหาร MEBS, (4) อาหาร MEBnico, (5) อาหาร MEB pH5, (6) อาหาร MEB pH8 (รูปล่างสุด).



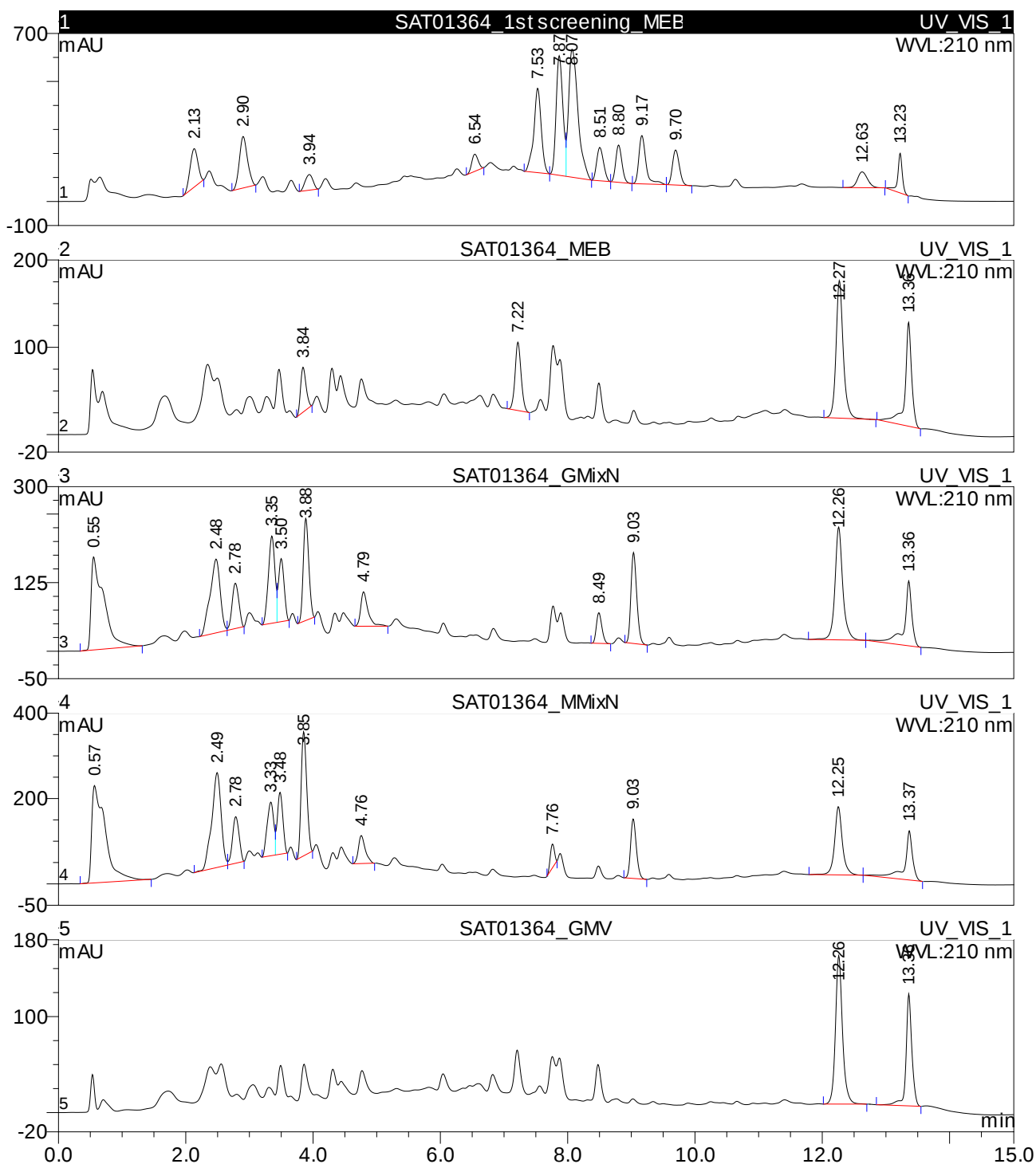
รูปที่ 22. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Platystomum scabridisporium* (SAT01364) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร MEB ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร MEB ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสถานะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) อาหาร PDB, (4) อาหาร PDBS (รูปล่างสุด).



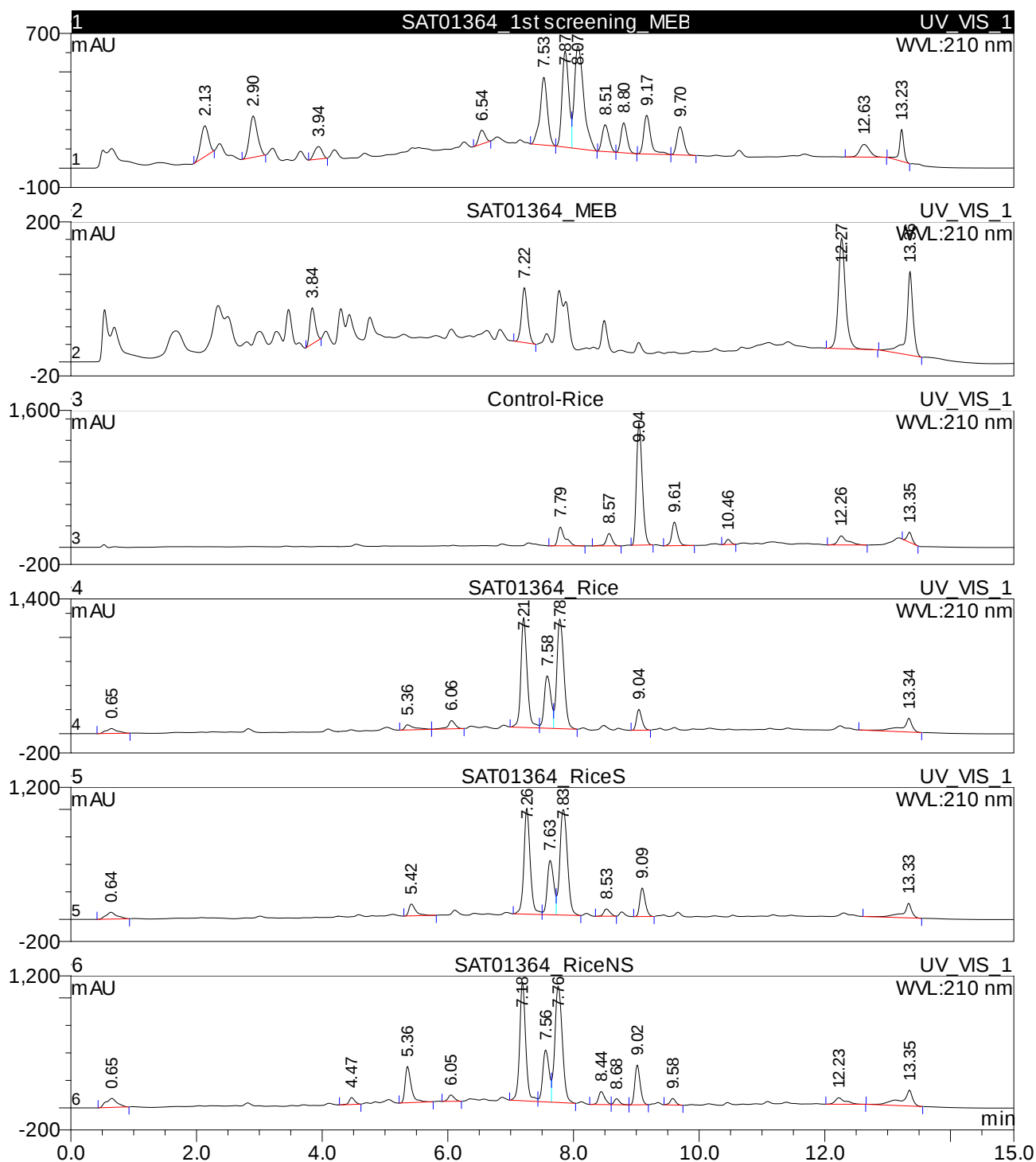
รูปที่ 23. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Platystomum scabridisporium* (SAT01364) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร MEB ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร MEB ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) อาหาร Jackson, (4) อาหาร Tekeuchi, (5) อาหาร Czp malt (รูปล่างสุด).



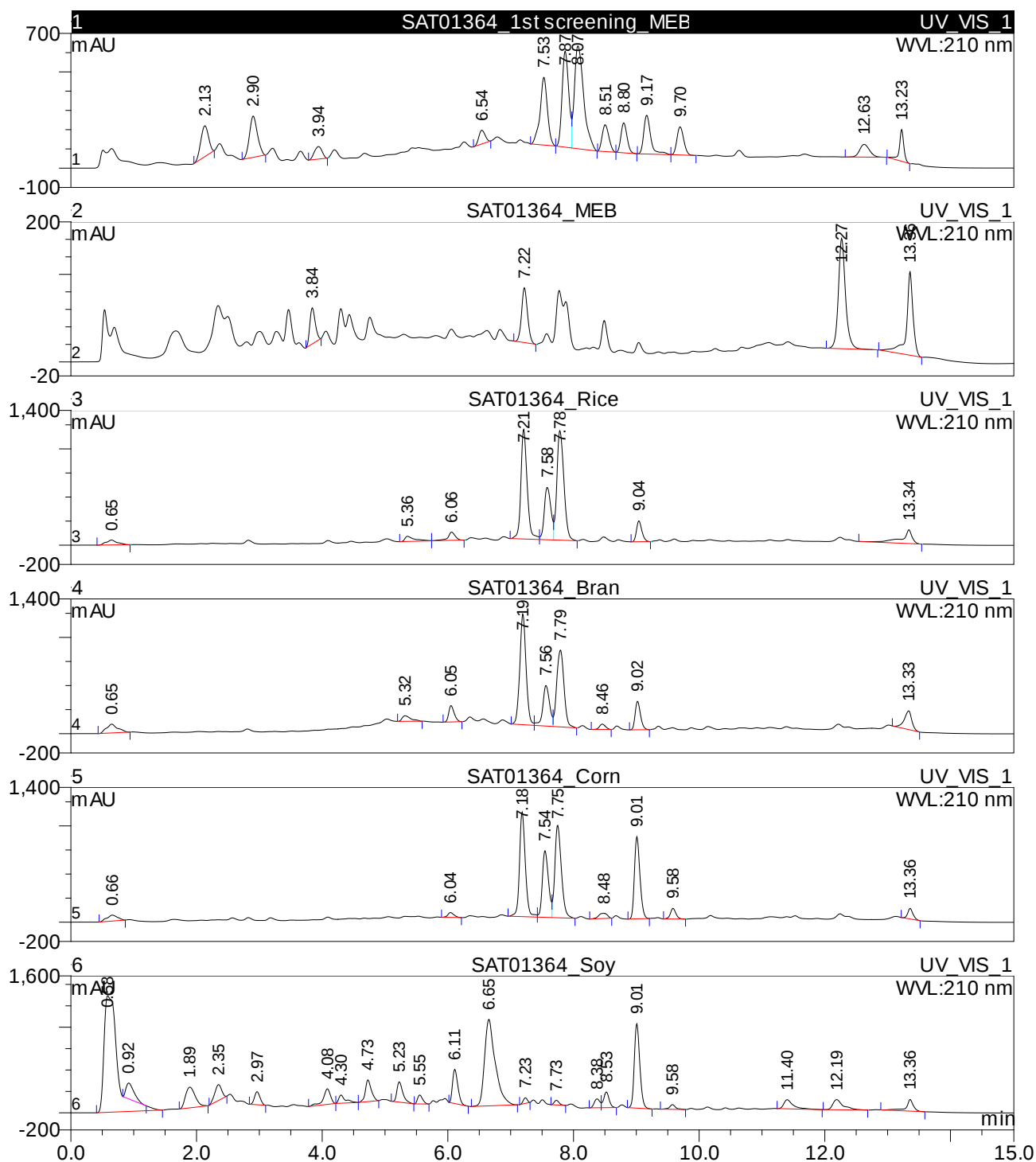
รูปที่ 24. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Platystomum scabridisporium* (SAT01364) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร MEB ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร MEB ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) อาหาร SDB, (4) อาหาร YOS, (5) อาหาร YESD (รูปล่างสุด).



รูปที่ 25. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Platystomum scabridisporium* (SAT01364) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร MEB ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร MEB ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) อาหาร GMixN, (4) อาหาร MMixN, (5) อาหาร GMV (รูปล่างสุด).



รูปที่ 26. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Platystomum scabridisporium* (SAT01364) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร MEB ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร MEB ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (4) Rice, (5) RiceS, (6) RiceNS (รูปล่างสุด) เปรียบเทียบกับ (3) Control-Rice (ข้าวเปล่า ๆ ที่ไม่มีการเติมเชื้อลงไป).



รูปที่ 27. HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Platystomum scabridisporium* (SAT01364) ที่เลี้ยงใน (1) อาหาร MEB ณ ขั้นตอนการเลือก (1st screening; รูปบนสุด) (2) อาหาร MEB ณ ขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร (เพื่อใช้เปรียบเทียบและเป็นสภาวะเดียวกับขั้นตอนการเลือก (1st screening), (3) Rice, (4) Bran, (5) Corn, (6) Soy (รูปล่างสุด).

จากผลการวิเคราะห์สารสกัดที่ได้จากการปรับเปลี่ยนอาหาร สภาวะในการเลี้ยง สามารถตั้งข้อสังเกตหรือสรุปได้ดังนี้ คือ

4.4.1 เชื้อราสายพันธุ์ *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335 (SPP27-1)

- เชื้อไม่สามารถผลิตสารได้ดีเหมือนในครั้งแรก (1st screening) โดยน้ำหนักของสารสกัดเมื่อเลี้ยงใน LCN ขณะทำการปรับเปลี่ยนอาหาร (1.5 mg) น้อยกว่าน้ำหนักสารสกัดใน LCN เมื่อเลี้ยงในครั้งแรก (14.1 mg) (1st screening) อย่างมาก (ตามตารางที่ 12) อีกทั้ง HPLC profile ขณะทำการปรับเปลี่ยนอาหาร ยังไม่เหมือนกับตอน 1st screening (รูปที่ 9) และไม่มี peaks ของสารที่น่าสนใจ (ซึ่ง peaks ในช่วง retention times ที่น่าทึ่งกัน ๆ ดังใน HPLC chromatogram จะเป็นสารที่ค่อนข้างมีขี้ ซึ่งอาจจะประกอบด้วย ส่วนประกอบจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และ common metabolite เช่น diketopiperazine เป็นต้น)

- หลังจากการปรับเปลี่ยนอาหาร น้ำหนักของสารสกัดในอาหารเหลืออื่น ๆ มีปริมาณต่ำ และไม่มี peak ที่น่าสนใจอย่างเห็นได้ชัด ใน HPLC chromatogram

- สำหรับอาหารแข็ง major peak ใน HPLC chromatograms จะเป็น peak ที่พบได้ในอาหารเปล่า ๆ ที่ไม่มีการใส่เชื้อลงไป ซึ่งอาจจะเป็นสารพวก fatty acid (เนื่องจากค่อนข้างจะไม่มีขี้ และมี common UV spectrum)

- ดังนั้นสำหรับเชื้อราสายพันธุ์นี้ เชื้ออาจสูญเสียการสร้างสาร metabolite เมื่อนำมาเลี้ยงอีกครั้ง หรือ สภาวะในการเลี้ยง ปริมาณและการเจริญเติบโตของหัวเชื้ออาจจะไม่เหมาะสม ทำให้เชื้อไม่อยู่ในสภาวะที่สามารถสร้างสารที่น่าสนใจได้

4.4.2 เชื้อราสายพันธุ์ *Trimmatostroma* sp. (AK0101)

- เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักและ HPLC chromatograms ของสารสกัดจากเชื้อรา *Trimmatostroma* sp. (AK0101) ในอาหาร LL ทั้งสองครั้ง (ขั้น 1st screening และขั้นตอนการปรับเปลี่ยนอาหาร) พบว่าเชื้อมีการสร้างสารเมตาบอไลต์ที่คล้ายกับครั้งแรก แต่มีปริมาณต่ำกว่า (จากน้ำหนักสารสกัดใน LL ตามตารางที่ 12 และ HPLC chromatograms ดังรูปที่ 15)

- การเติมเกลือ และ nicotinamide ซึ่งมีการรายงานว่าเป็น NAD⁺-dependent histone deacetylase inhibitor ไม่ส่งผลต่อน้ำหนักสารสกัดและ HPLC profiles มากนัก

- ในอาหารเหลืออื่น ๆ เช่น Jackson, Tekeuchi, Czp malt และ อื่น ๆ พบว่าน้ำหนักสารสกัดที่ได้มีปริมาณน้อย และ HPLC profiles ไม่ค่อยแตกต่างจากอาหารเริ่มต้น คือ LL อีกทั้งบาง peaks จะมี intensities ลดลงเมื่อเทียบกับ LL (รูปที่ 16–18)

- สำหรับอาหารแข็ง พบว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารแข็งมี HPLC profiles ที่แตกต่างไปจากอาหารดั้งเดิม (LL) นอกจากนั้น UV spectra ของ peaks ยังแตกต่างจากไปจากเดิมอีกด้วย (รูปที่ 19 และ 20)

- สารสกัดจากอาหารแข็งซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) มีน้ำหนักมากกว่า อาหารแข็งที่มีการเลี้ยงเชื้อลงไป ทำให้ไม่สามารถทราบถึงน้ำหนักของเมตาบอไลต์ซึ่งสร้างจากเชื้อราได้ โดยอาจเป็นเพราะเชื้อมีการย่อยและใช้อาหารสำหรับการเจริญเติบโต ทำให้อาหารมีปริมาณลดลงและสารสกัดจากอาหารก็ลดลงด้วย หรืออาจเป็นผลการผิดพลาดจากการสกัด หรือการชั่งสาร

4.4.3 เชื้อราสายพันธุ์ *Platystomum scabridisporium* (SAT01364)

- เชื้อยังสามารถผลิตสารได้เหมือนในครั้งแรก (1st screening) แต่จำนวนและปริมาณลดลงอย่างมาก (รูปที่ 21) โดยน้ำหนักของสารสกัดเมื่อเลี้ยงใน MEB ขณะทำการปรับเปลี่ยนอาหาร (0.5 mg) น้อยกว่าน้ำหนักสารสกัดใน MEB เมื่อเลี้ยงในครั้งแรก (1.9 mg) (1st screening) (ตามตารางที่ 12) อีกทั้ง HPLC profile ขณะทำการปรับเปลี่ยนอาหาร และ peaks ของสารที่น่าสนใจ มีจำนวนและ intensities ลดลงอย่างมาก

- หลังจากการปรับเปลี่ยนอาหาร น้ำหนักของสารสกัดในอาหารเหลวอื่น ๆ เช่น Jackson, Tekeuchi, Czp malt และ อื่น ๆ มีปริมาณต่ำ ส่วน HPLC profiles คล้ายกับใน MEB ยกเว้น Jackson ที่ให้ HPLC profile ค่อนข้างแตกต่างจากอาหารเหลวชนิดอื่น แม้ว่าจะมีจำนวน peaks มาก แต่ intensities ของแต่ละ peaks ค่อนข้างต่ำ จึงไม่ได้ถูกเลือกเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

- สำหรับอาหารแข็ง HPLC profiles ของสารสกัดจากเชื้อที่เลี้ยงในอาหารแข็ง (รูปที่ 26 และ 27) ค่อนข้างคล้ายกับใน MEB เมื่อเลี้ยงในครั้งแรก (1st screening) แต่ให้จำนวน peaks ที่น้อยกว่า ซึ่งการเลี้ยงในอาหารแข็ง เชื้อมีการผลิตสารที่ดีกว่าใน MEB ซึ่งเลี้ยงในครั้งเดียวกัน แต่ไม่ดีเท่ากับการเลี้ยงใน MEB ในครั้งแรก (1st screening)

- ดังนั้นสำหรับเชื้อราสายพันธุ์นี้ เชื้ออาจมีการสร้างสาร metabolite ที่แย่งเมื่อเทียบกับครั้งแรก ซึ่งอาจเป็นเพราะเชื้อไม่ค่อย active หรือ สภาวะในการเลี้ยง ปริมาณและการเจริญเติบโตของหัวเชื้ออาจจะไม่ค่อยเหมาะสม ทำให้เชื้อสามารถสร้างสารที่น่าสนใจได้ในปริมาณต่ำ

จากผลการทดลองในการปรับเปลี่ยนอาหาร สภาวะในการเลี้ยงสำหรับเชื้อ *Astrosphaeria nypae* BCC 5335 (SPP27-1), *Trimmatostroma* sp. (AK0101) และ *Platystomum scabridisporium* (SAT01364) สรุปได้ว่า เฉพาะเชื้อราสายพันธุ์ *Trimmatostroma* sp. (AK0101) ให้ผลที่แตกต่างเมื่อมีการปรับเปลี่ยนอาหาร โดยเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง สารสกัดที่ได้มี HPLC profiles ที่แตกต่างจากอาหารเหลวเดิม (LL) อีกทั้ง peaks ของสารซึ่งเลี้ยงในอาหารแข็ง มี UV chromatogram ที่แตกต่างจากเดิม (LL) ด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงได้ทำการเลือกเชื้อสายพันธุ์นี้ เพื่อเลี้ยงในอาหารข้าว + เกลือ (RiceS) ในขนาดขยายต่อไป แล้วจะได้ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ เพื่อไปเปรียบเทียบกับสารที่จะทำการแยกจากอาหารเดิม คือ LL ต่อไป

บทที่ 5

ผลลัพธ์และประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัย

5.1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่ได้คาดไว้ในสัญญาโครงการ

- (1). **Bunyapaiboonsri, T.**; Yoiprommarat, S.; Nopgason, R.; Intereya, K.; Suvannakad, R.; Sakayaroj, J. Palmarumycins from the Mangrove Fungus BCC 25093. *Tetrahedron*, **2015**, 71, 5572-5578.
- (2). Chokpaiboon, S.; Unagul, P.; Kongthong, S.; Danwisetkanjana, K.; Pilantanapak, A.; Suetrong, S.; **Bunyapaiboonsri, T.** A pyrone, naphthoquinone, and cyclic urea from the marine-derived fungus *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335. *Tetrahedron Lett.*, **2016**, 57, 1171-1173.
- (3). **Bunyapaiboonsri, T.**; Yoiprommarat, S.; Lapanun, S.; Balram, U.; Chanthaket, R.; Klaysuban, A.; Suetrong, S. Trichothecenes from the Fungus *Acremonium crocinigenum* BCC 20012. *Phytochem. Lett.*, **2016**, 18, 39-43.

5.2. ผลงานอื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- การนำเสนอด้วยวาจา ในการประชุมวิชาการนานาชาติ Pure and Applied Chemistry International Conference 2017 (PACCON 2017) ในหัวข้อเรื่อง “Bioactive Secondary Metabolites from Marine Fungi” (วันที่ 2 ก.พ. 2560)

- การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการนานาชาติ Pure and Applied Chemistry International Conference 2017 (PACCON 2017) ในหัวข้อเรื่อง “Bioactive Secondary Metabolites from the Mangrove Fungus BCC 25093” (รายชื่อผู้เสนอผลงาน Seangaroon Yoiprommarat, Rujirek Nopgason, Kamolphan Intereya, Rapheephat Suvannakad, and Jariya Sakayaroj, Taridaporn Buajarern*)

เอกสารอ้างอิง

1. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 196-268.
2. Pietra, F. *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14*, 453-464.
3. Mayer, A. M. S.; Gustafson, K. R. *Eur. J. Cancer* **2008**, *44*, 2357-2387.
4. Mayer, A. M. S.; Rodríguez, A. D.; Berlinck, R. G. S.; Hamann, M. T. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 283-308.
5. Mayer, A. M. S.; Glaser, K. B.; Cuevas, C.; Jacobs, R. S.; Kem, W.; Little, R. D.; McIntosh, J. M.; Newman, D. J.; Potts, B. C.; Shuster, D. E. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31*, 255-265.
6. Fenical, W.; Jensen, P. R.; Cheng, X. C. U.S. Patent 6,069,149, **2000**.
7. Kanoh, K.; Kohno, S.; Asari, T.; Harada, T.; Katada, J.; Muramatsu, M.; Kawashima, H.; Sekiya, H.; Uno, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2847-2852.
8. Rateb, M. E.; Ebel, R. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 290-344.
9. Bugni, T. S.; Ireland, C. M. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 143-163.
10. Saleem, M.; Ali, M. S.; Hussain, S.; Jabbar, A.; Ashraf, M.; Lee, Y. S. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1142-1152.
11. <http://www.who.int/infectious-disease-report/pages/ch2text.html>
12. Smith, C. V.; Sharma, V.; Sacchettini, J. C. *Tuberculosis* **2004**, *84*, 45-55.
13. Wongsrichanalai, C.; Pickard, A. L.; Wernsdorfer, W. H.; Meshnick, S. R. *Lancet Infect. Dis.* **2002**, *4*, 209-214.
14. Poole, K. *Curr. Opin. Microbiol.* **2001**, *4*, 500-508.
15. Freire-Moran, L.; Aronsson, B.; Manz, C.; Gyssens, I. C.; So, A. D.; Monnet, D. L.; Cars, O.; the ECDC-EMA Working Group *Drug Resist. Update* **2011**, *14*, 118-124.
16. Chutrakul, C.; Boonruangprapa, T.; Suvannakad, R.; Isaka, M.; Sirithunya, P.; Toojinda, T.; Kirtikara, K. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *107*, 1624-1631.
17. Sesma, A.; Osbourn, A. E. *Nature* **2004**, *431*, 582-586.
18. Pakdeevaporn, P.; Wasee, S.; Taylor, P.; Mongkolporn, O. *Plant Breeding* **2005**, *124*, 206-208.
19. Chutrakul, C.; Khaokhajorn, P.; Auncharoen, P.; Boonruengprapa, T.; Mongkolporn, O. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, *77*, 259-265.
20. Amagata, T.; Doi, M.; Ohta, T.; Minoura, K.; Numata, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 3585-3599.
21. Garo, E.; Starks, C. M.; Jensen, P. R.; Fenical, W.; Lobkovsky, E.; Clardy, J. *Nat. Prod.* **2003**, *66*, 423-426.
22. Fenical, W.; Jensen, P. R.; Cheng, X. C. U.S. Patent 6,066,635, **2000**.
23. Cueto, M.; Jensen, P. R.; Kauffman, C.; Fenical, W.; Lobkovsky, E.; Clardy, J. *Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1444-1446.
24. Chokpaiboon, S.; Sommit, D.; Teerawatananond, T.; Muangsin, N.; Bunyapaiboonsri, T.; Pudhom, K. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1005-1007.

25. Chokpaiboon, S.; Sommit, D.; Bunyapaiboonsri, T.; Matsubara, K.; Pudhom, K. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2290-2294.
26. Yamada, T.; Imai, E.; Nakatuji, K.; Numata, A.; Tanaka, R. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6294-6294.
27. Li, Y.; Ye, D.; Chen, X.; Lu, X.; Shao, Z.; Zhang, H.; Che, Y. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 912-916.
28. Xu, M.; Gessner, G.; Groth, I.; Lange, C.; Christner, A.; Bruhn, T.; Deng, Z.; Li, X.; Heinemann, S. H.; Grabley, S.; Bringmann, G.; Sattler, I.; Lin, W. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 435-444.
29. Wei, H.; Itoh, T.; Kinoshita, M.; Kotoku, N.; Aoki, S.; Kobayashi, M. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8054-8058.
30. Tsuda, M.; Kasai, Y.; Komatsu, K.; Sone, T.; Tanaka, M.; Mikami, Y.; Kobayashi, J. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3087-3089.
31. Harris, G. H.; Hoogsteen, K.; Silverman, K. C.; Raghoobar, S. L.; Bills, G. F.; Lingham, R. B.; Smith, J. L.; Dougherty, H. W.; Cascales, C.; Peláez, F. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 2139-2144.
32. Wright, A. D.; Lang-Unnasch, N. *Planta Med.* **2005**, *71*, 964-966.
33. Hsiao, C.-J.; Hsiao, S.-H.; Chen, W.-L.; Guh, J.-H.; Hsiao, G.; Chan, Y.-J.; Lee, T.-H.; Chung, C.-L. *Chem.-Biol. Interact.* **2012**, *197*, 23-30.
34. Oh, D.-C.; Jensen, P. R.; Fenical, W. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8625-8628.
35. Cruz, L. J.; Insua, M. M.; Baz, J. P.; Trujillo, M.; Rodriguez-Mias, R. A.; Oliveira, E.; Giralt, E.; Albericio, F.; Cañedo, L. M. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2006.
36. Du, L.; Yang, X.; Zhu, T.; Wang, F.; Xiao, X.; Park, H.; Gu, Q. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 873-876.
37. Zhuang, Y.; Teng, X.; Wang, Y.; Liu, P.; Li, G.; Zhu, W. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1130-1133.
38. Huang, X.; Huang, H.; Li, H.; Sun, X.; Huang, H.; Lu, Y.; Lin, Y.; Long, Y.; She, Z. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 721-723.
39. Carr, G.; Tay, W.; Bottiell, H.; Anderson, S. K.; Mauk, A. G.; Anderson, R. J. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2996-2999.
40. Mohamed, I. E.; Gross, H.; Pontius, A.; Kehraus, S.; Krick, A.; Kelter, G.; Maier, A.; Fiebig, H.-H.; König, M. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5014-5017.
41. An, C.-Y.; Li, X.-M.; Li, C.-S.; Wang, M.-H.; Xu, G.-M.; Wang, B.-G. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2682-2694.
42. Julianti, E.; Lee, J.-H.; Liao, L.; Park, W.; Park, S.; Oh, D.-C.; Oh, K.-B.; Shin, J. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1286-1289.
43. Chinworrungsee, M.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Rungrod, A.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1965-1969.
44. Isaka, M.; Suyarnsestakorn, C.; Tanticharoen, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1561-1566.

45. Kato, H.; Yoshida, T.; Tokue, T.; Nojiri, Y.; Hirota, H.; Ohta, T.; Williams, R. M.; Tsukamota, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2254-2256.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. ผลงานตีพิมพ์ในหัวข้อเรื่อง “Palmarumycins from the mangrove fungus BCC 25093” ในวารสารนานาชาติ “Tetrahedron” ปี 2015 ฉบับที่ 71 หน้า 5572-5578



Palmarumycins from the mangrove fungus BCC 25093



Taridaporn Bunyapaiboonsri*, Seangaroon Yoiprommarat, Rujirek Nopgason,
Kamolphan Intereya, Rapheephath Suvannakad, Jariya Sakayaroj

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Thailand
Science Park, Phahonyothin Road, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 February 2015

Received in revised form 5 June 2015

Accepted 16 June 2015

Available online 21 June 2015

Keywords:

Palmarumycin

Spirodioxynaphthalene

Pleosporales

Mangrove fungus

Antimalarial activity

Antituberculosis activity

ABSTRACT

Palmarumycins P₁–P₅ (**1**–**5**), together with previously described decaspirones A and C (**6**, **7**), palmarumycins CP₃, CP₄, CP₁₇, CR₁, and M₂ (**8**–**12**), and a known diaryl ether (**13**) were isolated from the mangrove fungus BCC 25093. Compounds **1** and **6**–**8** showed antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* K1 with IC₅₀ values ranging between 2.23 and 2.36 µg/ml, and exhibited antituberculosis activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra with MIC values of 1.56 µg/ml (for compounds **1** and **6**), and 3.13 µg/ml (for compounds **7** and **8**). Cytotoxicity to Vero cells were observed for these compounds with IC₅₀ values of 0.10–0.91 µg/ml.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Spirodioxynaphthalenes are a group of compounds consisting of a 1,8-dihydroxynaphthalene unit linked with a second oxidized naphthalene moiety through a spiroketal linkage. These include palmarumycins, cladospirones, diepoxins, decaspirones, pressomerins and spiroxins. They have been reported as fungal and plant metabolites with a variety of biological activities, for example anticancer, antibacterial, antifungal, antileishmanial activities.¹ In our ongoing research on novel bioactive compounds from fungi, strain BCC 25093 was isolated from an unidentified mangrove wood, collected at Hat Khanom, Mu Ko Thale Tai National Park, Surat Thani province, Thailand. This fungus was identified as a member of the Pleosporales, which is the largest order in the fungal class Dothideomycetes,² based on morphological and phylogenetic data. The crude extract of BCC 25093 showed anti-bacterial activity against *Bacillus cereus* with an MIC value of 100 µg/ml. Further study of the large scale fermentation led to the isolation and structure elucidation of five new palmarumycins P₁–P₅ (**1**–**5**), known decaspirones A and C (**6**, **7**),³ palmarumycins CP₃,^{4,5} CP₄,⁴ CP₁₇,⁶ CR₁,⁷ and M₂⁸ (**8**–**12**), and a known diaryl ether (**13**).⁹

2. Results and discussion

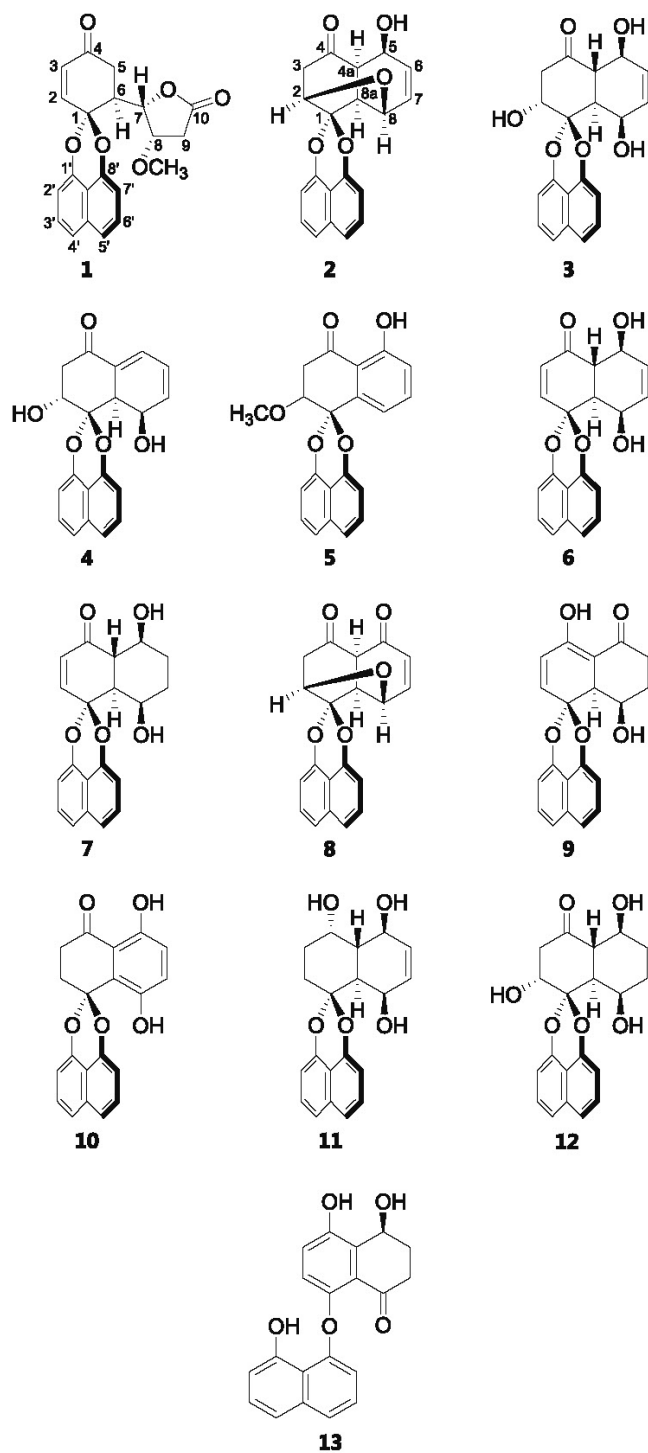
The crude EtOAc extract of the culture broth of BCC 25093 was initially chromatographed on Sephadex LH-20. The resulting fractions were further purified by silica gel chromatography and reversed phase HPLC to afford **3**, **4**, **6**–**9**, and **12**. The crude mycelial extract was separated by silica gel column chromatography to yield **11** after trituration the corresponding fraction with MeOH. Other resulting fractions from silica gel column were further purified by reversed phase HPLC to give **1**, **2**, **5**, **8**, **10**, and **13**.

Palmarumycin P₁ (**1**) had a molecular formula C₂₁H₁₈O₆ as deduced from HRESIMS. Its IR spectrum revealed absorption bands at 1786 (butyrolactone) and 1689 (unsat. C=O) cm^{−1}. Analysis of 2D NMR data of **1** revealed a similar 1,8-dioxygenated naphthalene moiety to other known palmarumycins.^{1,3–9} However, the second half of the molecule, which is usually a modified decalin or an oxidized naphthalene moiety, was replaced by a cyclohexenone connected to a β-methoxy-γ-butyrolactone instead. The ¹H NMR and COSY spectra demonstrated spin systems as shown in Fig. 1. A cyclohexenone ring was supported by key HMBC correlations from H-3 and H-6 to spiroketal carbon C-1 (δ_C 98.1), from H-2 and H₂-5 to an α,β-unsaturated ketone carbonyl C-4 (δ_C 195.8), from H-3 to C-5, and from H-2 to C-6. The HMBC correlations from the methoxy protons (8-OCH₃) to C-8, from H-8 and H₂-9 to lactone carbonyl C-10 (δ_C 174.3), and from H-7 to C-1, C-5, and C-6 supported a β-methoxy-γ-butyrolactone moiety and established its connectivity

* Corresponding author. Tel.: +66 2 5646700x3553; fax: +66 2 5646707; e-mail address: taridaporn@biotec.or.th (T. Bunyapaiboonsri).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2015.06.061>

0040-4020/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.



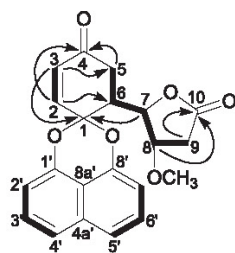


Fig. 1. COSY (in bold) and key HMBC correlations for **1**.

to the cyclohexenone ring at C-6. The 1,8-dioxynaphthalene fragment was linked to the cyclohexenone via a spiroketal carbon C-1. The large coupling constant between H-5 β and H-6 ($J=10.9$ Hz) suggested a pseudo-chair conformation of the cyclohexenone ring, and a pseudo-axial position of H-6. NOESY cross peaks (observed in CDCl₃) from H-7 to H-5 β and H-9 β , from the methoxy protons (8-OCH₃) to H-9 α and H-2', and from H-6 to H-8 supported the relative stereochemistry of the β -methoxy- γ -butyrolactone and its attachment to the cyclohexenone ring as shown in Fig. 2. Based on inspection of the structures, it is reasonable to assume that palmarumycin P₁ (**1**) is biogenetically derived from palmarumycin CP₃ (**8**). This was supported by treating **8** with K₂CO₃ in MeOH–CH₂Cl₂ (1:1) at room temperature for 3 h, which gave a trace amount of **1** as shown in Scheme 1. ¹H, ¹³C NMR and MS data of a fraction obtained after partial purification of the crude reaction mixture with silica gel and Sephadex column chromatography showed an excellent match with those observed for **1**.

Palmarumycin P₂ (**2**) was isolated as a yellow powder. Its HRESIMS exhibited the [M+Na]⁺ peak at m/z 359.0899, indicating a molecular formula of C₂₀H₁₆O₅ and thus thirteen degrees of unsaturation. Analysis of ¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, HMQC, and HMBC spectra of **2** revealed a close similarity to those of

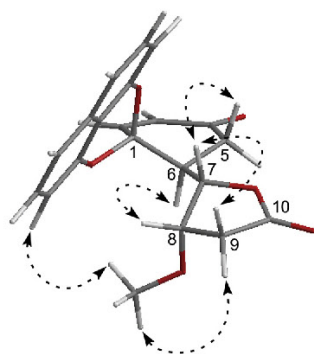


Fig. 2. Selected NOESY correlations for **1**.

palmarumycin CP₃ (**8**),⁴ except that the α,β -unsaturated ketone carbonyl at C-5 (δ_C 189.9) in **8** was reduced to a hydroxyl function ($\delta_{H/C}$ 4.17/69.1, δ_H 4.72, 5-OH) in **2**. Neither vicinal coupling nor a COSY correlation was observed between H-5 and H-6, suggesting that the dihedral angle was close to 90°. COSY data and HMBC correlations from H-2 to C-1, C-4, and C-8a; from H₂-3 to C-1, C-4, and C-4a; from H-4a to C-1, C-4 and C-6; and from H-5 to C-4 and C-7 established the structure of the decalin moiety. The molecular formula, degrees of unsaturation, and the HMBC correlation from H-2 to C-8 suggested the oxygen bridge between C-2 and C-8, while the small coupling constant of 4.2 Hz between H-4a and H-8a indicated a *cis*-ring junction. Since these two protons were oriented in the α -position, therefore it is proposed that the oxygen bridge is on the β -face. The relative configuration of H-5 was deduced based on NOESY correlation observed between H-5 and H-8a (Fig. 3).

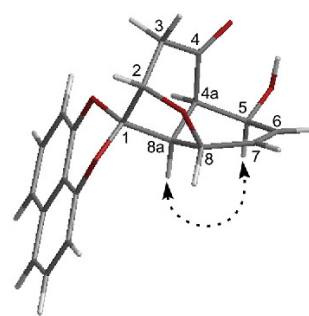
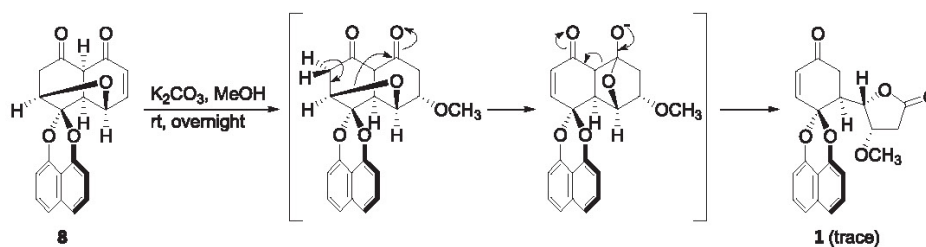


Fig. 3. Selected NOESY correlations for **2**.

Palmarumycin P₃ (**3**) was isolated as a white solid. Its HRESIMS displayed a molecular ion [M+Na]⁺ at m/z 377.0998, which was consistent with the molecular formula of C₂₀H₁₈O₆ and twelve degrees of unsaturation. Its molecular formula differed from that of **2** by the addition of one oxygen and two hydrogen atoms. The ¹H and ¹³C NMR spectra of **3** demonstrated two additional hydroxyl protons (δ_H 5.02, 2-OH; δ_H 3.98, 8-OH) and upfield shifts of two oxygenated methines (δ_C 67.0, C-2; δ_C 62.1, C-8) in comparison to **2** (δ_C 75.9, C-2; δ_C 71.6, C-8). According to these data, the oxygen bridge between C-2 and C-8 for **2** was opened to yield two hydroxyl groups for **3**. The relative stereochemistry of **3** was deduced from ³J_{H-H} coupling constants and NOESY spectroscopic data. The large coupling constant, ³J_{H4a-H8a} of 13.3 Hz and ³J_{H4a-H5} of 8.8 Hz, suggested a *trans*-ring junction and an axial position of H-5. The equatorial position of H-2 and H-8 were supported by the small coupling constants, ³J_{H2-H3 β} of 3.1 Hz and ³J_{H8-H8a} of 2.8 Hz.

Palmarumycin P₄ (**4**) possessed the molecular formula C₂₀H₁₆O₅ as deduced from HRESIMS. Analysis of NMR spectroscopic data of **4** revealed the similarity to those of **3**, except that the methine at C-4a ($\delta_{H/C}$ 3.18/47.7) and the hydroxymethine at C-5 ($\delta_{H/C}$ 4.52/67.4, δ_H



Scheme 1. Proposed mechanism for the observed chemical conversion of palmarumycin CP₃ (**8**) to palmarumycin P₁ (**1**).

Table 1
¹H (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) data for palmarumycin P₁ (**1**) in acetone-*d*₆

Position	δ _H , mult. (J in Hz)	δ _C	HMBC	NOESY ^a
1		98.1		
2	6.87, d (10.3)	141.7	C-4, C-6	H-3
3	6.07, dd (10.3, 0.7)	131.7	C-1, C-5	H-2
4		195.8		
5	β 2.96, dd (17.3, 10.9) α 2.85, m ^b	35.7	C-1, C-4, C-6, C-7 C-1, C-3, C-4, C-6, C-7	H-5α, H-6, H-7 H-5β, H-6
6	3.49, ddd (10.9, 6.0, 5.1)	41.5	C-1, C-4, C-5, C-7/8	H-5α, H-5β, H-7, H-8
7	5.11, dd (6.0, 3.9)	79.9	C-1, C-5, C-6, C-8	H-5β, H-6, H-8, H-9β
8	4.27, dd (4.4, 3.9)	79.0	C-7, C-10, 8-OCH ₃	H-6, H-7, 8-OCH ₃ , H-9α, H-9β
9	β 2.85, m ^b α 2.66, d (17.5)	34.7	C-8, C-10	H-7, H-8 H-8, 8-OCH ₃
10		174.3		
1'		146.8 ^f		
2'	7.10, d (7.6) ^c	109.9 ^g	C-1', C-4', C-8a'	H-3', 8-OCH ₃
3'	7.56, dd (8.4, 7.6) ^d	127.7	C-1', C-4a'	H-2', H-4'
4'	7.65, d (8.4) ^e	121.2 ^h	C-2', C-4a', C-5'	H-3'
4a'		134.4		
5'	7.63, d (8.5) ^e	121.1 ^h	C-4', C-4a', C-7'	H-6'
6'	7.52, dd (8.5, 7.5) ^d	127.7	C-4a', C-8'	H-5', H-7'
7'	7.05, d (7.5) ^c	109.5 ^g	C-5', C-8', C-8a'	H-6'
8'		146.6 ^f		
8a'		113.5		
8-OCH ₃	3.40, s	56.1	C-8	H-8, H-9α, H-2'

^{c–h} Signals with the same index may be interchanged.

^a NOESY correlations observed in CDCl₃ (400 MHz).

^b Overlapped.

3.97, 5-OH) in **3** were replaced by a trisubstituted olefin (δ_C 130.9, C-4a; δ_{H/C} 7.18/129.9, CH-5) in **4**. The presence of an α,β-conjugated double bond resulted in the upfield shift of the ketone carbonyl (δ_C 193.8, C-4) in **4** when compared to that of **3** (δ_C 210.7).

Palmarumycin P₅ (**5**) possessed the molecular formula C₂₁H₁₆O₅ on the basis of HRESIMS. ¹H and ¹³C NMR data of **5** were similar to those of the known compound palmarumycin JC2 isolated from the stems of *Jatropha curcas*,¹⁰ except that the hydroxyl at C-2 of palmarumycin JC2 was replaced by a methoxy group (δ_{H/C} 3.28/58.6, 2-OCH₃) in **5**. As the specific rotation of **5** was close to zero ([α]_D²⁴ +2.64) in comparison to that reported for palmarumycin JC2 ([α]_D²⁵ +131.9),¹⁰ it is most likely that **5** was obtained as a racemic mixture rather than a pure stereoisomer.

Spectroscopic data of **6–13** were consistent with those reported in the literature for the known decaspiroones A and C,³

palmarumycins CP₃,^{4,5} CP₄,⁴ CP₁₇,⁶ CR₁,⁷ and M₂,⁸ and diaryl ether **13**,⁹ respectively. The relative configuration of palmarumycin CR₁ (**11**), which had not been reported in the literature, was deduced as depicted based on ³J_{H–H} coupling constants and NOESY data (see, Experimental).

Biological activities, including antimalarial, antituberculosis, antibacterial, and cytotoxic activities, of compounds **1–3**, **5–8**, **10**, and **11** are presented in Table 4. Compounds **1** and **6–8** exhibited antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* K1 with similar IC₅₀ values (2.23–2.36 μg/ml), and also displayed antibacterial activity against *Bacillus cereus* with MIC values of 25 μg/ml (for **1**), and 12.5 μg/ml (for **6–8**). Growth inhibition against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra was also observed for compounds **1** and **6** with MIC=1.56 μg/ml, while **7** and **8** showed a weaker activity with MIC=3.13 μg/ml. Compounds **1–3**, **6–8** and **11** exhibited cytotoxic

Table 2
¹H (500 MHz) data for palmarumycins P₂–P₅ (**2–5**) in acetone-*d*₆

Position	2 δ _H , mult. (J in Hz)	3 δ _H , mult. (J in Hz)	4 δ _H , mult. (J in Hz)	5 δ _H , mult. (J in Hz)
2	4.40, ddd (3.4, 1.9, 1.4)	4.31, ddd (3.5, 3.5, 3.1)	4.40, ddd (4.1, 3.8, 3.6)	4.19, dd (3.5, 3.0)
3	2.95, ddd (18.3, 1.9, 1.0)	β 3.06, dd (15.1, 3.1) α 2.37, dd (15.1, 3.5)	2.86, dd (18.3, 4.1) 2.53, dd (18.3, 3.6)	3.30, dd (17.8, 3.0) 2.96, dd (17.8, 3.5)
4a	3.13, dddd (4.9, 4.2, 1.0, 0.8)	3.18, dd (13.3, 8.8)		
5	4.17, m	4.52, m	7.18, ddd (5.5, 3.7, 0.8)	
6	5.92, dd (10.1)	5.73, dd (10.1, 2.3)	6.41, dd (9.4, 5.5)	7.10, dd (8.4, 0.9)
7	5.85, ddd (10.1, 4.0, 2.4)	5.89, ddd (10.1, 5.4, 2.0)	6.48, dd (9.4, 5.5)	7.71, dd (8.4, 7.7)
8	4.67, dd (4.5, 4.0)	4.75, ddd (5.4, 4.3, 2.8)	4.77, ddd (5.5, 5.3, 4.2)	7.48, dd (7.7, 0.9)
8a	2.96, ddd (4.5, 4.2, 1.4)	2.83, dd (13.3, 2.8)	3.65, dd (4.2, 3.7)	
2'	7.19, d (7.6) ^a	7.07, d (7.6) ^d	7.02, dd (7.5, 0.5) ^f	7.16, dd (7.4, 0.9) ^h
3'	7.53, dd (8.3, 7.6) ^b	7.48, dd (8.2, 7.6) ^e	7.51, dd (8.3, 7.5) ^g	7.58, dd (8.3, 7.4) ⁱ
4'	7.66, d (8.3) ^c	7.56, d (8.2) ^k	7.57, m ^l	7.65, d (8.3) ^j
5'	7.64, d (8.3) ^c	7.56, d (8.2) ^k	7.57, m ^l	7.63, d (8.4) ^j
6'	7.54, dd (8.3, 7.6) ^b	7.49, dd (8.2, 7.6) ^e	7.47, dd (8.3, 7.6) ^g	7.51, dd (8.4, 7.6) ⁱ
7'	7.10, d (7.6) ^a	6.97, d (7.6) ^d	6.98, d (7.6) ^f	7.00, dd (7.6, 0.5) ^h
2-OH		5.02, br d (3.5)	5.08, br d (3.8)	
2-OCH ₃				3.28, s
5-OH	4.72, d (10.9)	3.97, d (3.4)		12.35, s
8-OH		3.98, d (4.3)	3.79, d (5.3)	

^{a–j} Signals with the same index may be interchanged.

^{k–l} Overlapped.

Table 3¹³C NMR (125 MHz) data for palmarumycins P₂–P₅ (2–5) in acetone-*d*₆

Position	2	3	4	5
1	106.3	102.6	103.7	99.0
2	75.9	67.0	64.9	75.7
3	47.0	44.6	42.8	40.2
4	214.7	210.7	193.8	202.0
4a	47.3	47.7	130.9	115.4
5	69.1	67.4	129.9	161.9
6	137.5	131.8	124.8	119.1
7	125.9	128.8	134.4	137.0
8	71.6	62.1	60.4	117.5
8a	42.4	41.8	43.4	139.3
1'	147.4 ^a	146.6 ^c	146.9 ⁱ	147.2 ^m
2'	109.5 ^b	109.1 ^f	109.8 ^j	109.6 ⁿ
3'	127.7 ^c	127.5 ^g	127.5 ^k	127.9 ^o
4'	121.6 ^d	120.6 ^h	120.4 ^l	120.9 ^p
4a'	134.7	134.2	134.2	134.3
5'	121.1 ^d	120.3 ^h	120.6 ^l	121.0 ^p
6'	127.6 ^c	127.6 ^g	127.6 ^k	127.7 ^o
7'	109.8 ^b	109.7 ^f	109.0 ^j	108.7 ⁿ
8'	147.1 ^a	146.9 ^c	146.7 ⁱ	147.4 ^m
8a'	114.1	113.7	113.6	113.3
2-OCH ₃				58.6

^a–^p Signals with the same index may be interchanged.

activities against Vero cell lines with IC₅₀ values ranging between 0.10 and 3.95 µg/ml. From these results, it is possible to conclude that the α,β-unsaturated ketone might be the key functionality that is responsible for the inhibitory activity of these compounds.

Antibacterial activity in agar diffusion test had been previously reported for compounds **6**–**9** and **12**.^{3,4,8} Antifungal activity against *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* had also been observed for compounds **6** (with respective MIC values of approximately 10, and 5 µg/ml) and **7** (with respective MIC values of >25, and 25 µg/ml).³ Antileishmanial activity and cytotoxicity to Vero cells had been described for compound **10** with IC₅₀ values of 1.34 and 174 µM, respectively.⁶

3. Conclusion

In this study, palmarumycins P₁–P₅ (**1**–**5**), the known decaspiroones A and C (**6**, **7**), palmarumycins CP₃, CP₄, CP₁₇, CR₁, and M₂ (**8**–**12**), and a known diaryl ether (**13**) were reported from the mangrove fungus BCC 25093, which was identified as a member of Pleosporales. Of these known secondary metabolites, palmarumycins CP₃ (**8**), CP₄ (**9**), and diaryl ether **13**; palmarumycin CP₁₇ (**10**); and palmarumycin M₂ (**12**) had been reported from

Coniothyrium palmarum,^{4,9} *Edenia* sp.,⁶ and *Microsphaeropsis* sp.,⁸ respectively, all of which belong to the same order, Pleosporales.^{2,11}

4. Experimental

4.1. General experimental procedures

Optical rotations were determined using a JASCO P-1030 digital polarimeter. UV and IR spectra were taken on a GBC Cintra 404 UV-Visible spectrophotometer and a Bruker VECTOR 22 spectrometer, respectively. NMR spectra were taken on a Bruker AV500D spectrometer. ESI-TOF mass spectra were recorded on a Bruker micro-TOF mass spectrometer.

4.2. Fungal material

The fungus was isolated from an unidentified mangrove wood collected at Hat Khanom, Mu Ko Thale Tai National Park, Surat Thani province, Thailand. The fungus was deposited at the BIOTEC Culture Collection as BCC 25093 on April 5, 2007. Total genomic DNA was extracted from lyophilized mycelia.¹² The large subunit (LSU) and ITS1-5.8S-ITS2 rDNA regions were amplified by PCR using the universal primers JS1, JS5, LR7, ITS4 and ITS5.¹³ Purified PCR products were sequenced by Macrogen Inc., Korea. Phylogenetic analysis of the sequence data using BioEdit 7.0.5.3¹⁴ and Paup 4.0b10¹⁵ programs indicated that this fungus was a member of the order Pleosporales (class Dothideomycetes). According to limitations of the existing phylogenetic database and uncertain taxonomic status of this order, it is at present not possible to identify strain BCC 25093 at genus or species level.¹⁶ The fungal DNA sequences have been submitted to GenBank with accession numbers KJ629168 (LSU rDNA) and KJ629169 (ITS1, ITS2, and 5.8S rDNA), respectively.

4.3. Fermentation, extraction, and isolation

BCC 25093 was maintained on potato dextrose agar (PDA) at 25 °C. The agar blocks (4×1 cm²) were finely chopped and transferred into Erlenmeyer flasks (4×250 mL), each containing 25 mL of potato dextrose broth (PDB). After incubation on a rotary shaker (200 rpm) for 4 days, the primary seed culture (4×25 mL) was transferred into Erlenmeyer flasks (4×1 L), each containing PDB (250 mL), then fermented on a rotary shaker (200 rpm) for 4 days. The secondary seed culture (40×25 mL) was subsequently transferred into Erlenmeyer flasks (40×1 L), each containing PDB (250 mL), then cultured at 25 °C for 20 days on rotary shakers (200 rpm). The culture was filtered to separate broth and mycelia.

Table 4Biological activities of compounds **1**–**3**, **5**–**8**, **10**, and **11**

Compound	<i>P. falciparum</i> (IC ₅₀ , µg/ml)	<i>M. tuberculosis</i> (MIC, µg/ml)	<i>B. cereus</i> (MIC, µg/ml)	Vero cell lines (IC ₅₀ , µg/ml)
1	2.36	1.56	25	0.79
2	>10	>50	>25	0.18
3	>10	12.5	>25	3.95
5	>10	>50	>25	>50
6	2.30	1.56	12.5	0.18
7	2.28	3.13	12.5	0.91
8	2.23	3.13	12.5	0.10
10	>10	>50	>25	>50
11	>10	12.5	>25	3.54
Dihydroartemisinin ^a	0.0004	—	—	—
Isoniazid ^b	—	0.023–0.047	—	—
Vancomycin ^c	—	—	2.0	—
Ellipticine ^d	—	—	—	1.79–2.43

^a Standard anti-malarial drug against *P. falciparum*.^b Standard anti-tuberculosis drug against *M. tuberculosis*.^c Standard anti-bacterial drug against *B. cereus*.^d Standard compound for cytotoxicity assay against African green monkey kidney fibroblast (Vero) cells.

The culture broth was extracted three times with an equal volume of EtOAc (3×10 L). The organic layer was concentrated under reduced pressure to obtain a brown gum (3.87 g). The crude extract was fractionated by Sephadex LH-20 column chromatography (elution with 100% MeOH) to provide 10 fractions (1–10). Fraction 4 (600 mg) was subjected to a silica gel column chromatography (step gradient, elution with 0–30% acetone in CH_2Cl_2) to afford 10 fractions (4-1–4-10). Fraction 4-4 (394 mg) was further purified by preparative HPLC using a reversed-phase column (SunFire C18 column, 19×250 mm, $10 \mu\text{m}$; flow rate 15 mL/min) and a linear gradient of MeCN:H₂O (50:50 → 60:40) over 25 min to yield decaspirone A (**6**, 33.0 mg, t_R 7.1 min) and decaspirone C (**7**, 25.4 mg, t_R 9.2 min). Fraction 4-6 (28 mg) was separated by semi-preparative HPLC (SunFire C18 column, 19×150 mm, $5 \mu\text{m}$; flow rate 10 mL/min) using a linear gradient of MeCN:H₂O (40:60 → 70:30) over 25 min to yield palmarumycin M₂ (**12**, 16.4 mg, t_R 5.8 min) and palmarumycin P₄ (**4**, 2.6 mg, t_R 7.0 min). Fraction 4-7 (181 mg) was purified by preparative HPLC using a linear gradient of MeCN:H₂O (30:70 → 50:50) over 25 min to yield palmarumycin P₃ (**3**, 120.2 mg, t_R 9.3 min). Fraction 5 (593 mg) was subjected to silica gel column chromatography (step gradient, elution with 0–10% MeOH in CH_2Cl_2) to obtain 11 fractions (5-1–5-11). Fraction 5-4 (55 mg) was separated by semi-preparative HPLC using a linear gradient of MeCN:H₂O (0:100 → 100:0) over 25 min to yield palmarumycin CP₃ (**8**, 15.6 mg, t_R 20.1 min), and palmarumycin CP₄ (**9**, 20.4 mg, t_R 21.2 min). Fraction 5-8 (214 mg) was purified by preparative HPLC using a linear gradient of MeCN:H₂O (0:100 → 100:0) over 25 min to yield palmarumycin M₂ (**12**, 78.9 mg, t_R 21.2 min).

The mycelia cakes were extracted with MeOH and filtered. To the filtrate was added H₂O (100 mL) and washed with hexane (800 mL). The aqueous MeOH layer was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc (700 mL) and washed with H₂O (200 mL). The organic layer was concentrated under reduced pressure to provide a dark brown gum (2.48 g). The crude mycelial extract was separated by silica gel column chromatography (step gradient, elution with 0–10% MeOH in CH_2Cl_2) to provide 12 fractions (1–12). Fraction 3 (122 mg) was further purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient of MeCN:H₂O (50:50 → 100:0) over 25 min to yield palmarumycin CP₁₇ (**10**, 51.7 mg, t_R 15.8 min) and palmarumycin P₅ (**5**, 3.8 mg, t_R 18.6 min). Fraction 6 (196 mg) was further purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient of MeCN:H₂O (20:80 → 90:10) over 25 min to yield palmarumycin CP₃ (**8**, 64.2 mg, t_R 19.0 min). Fractions 8 (73 mg) and 10 (252 mg) were further purified by semi-preparative HPLC a linear gradient of MeCN:H₂O (45:55 → 65:35) over 25 min to yield palmarumycin P₂ (**2**, 12.3 mg, t_R 15.5 min) and P₁ (**1**, 3.7 mg, t_R 23.3 min) from fraction 8; and a diaryl ether (**13**, 50.0 mg, t_R 13.2 min) from fraction 10. Fraction 12 (37 mg) was triturated in MeOH (5.0 mL) and then filtered to leave a white solid palmarumycin CR₁ (**11**, 6.7 mg).

4.3.1. Palmarumycin P₁ (1**).** Yellow powder; mp 112–114 °C; $[\alpha]_D^{25} +139.9$ (c 0.18, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 200 (3.76), 225 (3.78), 271 (3.94) nm; IR (KBr) ν_{max} 2929, 1786, 1689, 1608, 1414, 1382, 1275, 1155, 1092, 919, 824, 759 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; HRMS (ESI-TOF) m/z 389.1005 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{Na}$, 389.1001).

4.3.2. Palmarumycin P₂ (2**).** Yellow powder; mp 211–213 °C; $[\alpha]_D^{25} -100.2$ (c 0.025, CH_2Cl_2); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 202 (3.77), 226 (4.03), 275 (3.60), 327 (2.89) nm; IR (KBr) ν_{max} 3484, 2916, 1703, 1610, 1410, 1378, 1274, 1049, 821, 758 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data, see Tables 2 and 3; HMBC (acetone- d_6 , 500 MHz) H-2/C-1, C-4, C-8, C-8a; H-2/C-1, C-2, C-4, C-4a; H-4a/C-4, C-5, C-6, C-8, C-8a; H-5/C-4, C-4a, C-6, C-7; 5-OH/C-4a, C-5, C-8; H-6/C-4a, C-5, C-8; C-8a; H-8/C-4a, C-6, C-7; H-8a/C-1, C-2, C-4, C-5; H-2'/C-1', C-4', C-

8a'; H-3'/C-1', C-2', C-4a'; H-4'/C-2', C-4a', C-8', C-8a'; H-5'/C-1', C-4a', C-7', C-8a'; H-6'/C-4a', C-7', C-8'; H-7'/C-5', C-8', C-8a'; NOESY (CDCl_3 , 500 MHz) H-2/H₂-3, H-3 α /H-4a, H-4a/H-5, H-4a/H-8a, H-5'/H-6, H-5'/H-8a, H-6'/H-7, H-7'/H-8, H-8'/H-8a, H-2'/H-3', H-3'/H-4', H-5'/H-6', H-6'/H-7'; HRMS (ESI-TOF) m/z 359.0899 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{Na}$, 359.0895).

4.3.3. Palmarumycin P₃ (3**).** White solid; mp 146–148 °C; $[\alpha]_D^{24} -107.9$ (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 327 (3.55) nm; IR (film, CHCl_3) ν_{max} 3385, 2918, 1704, 1607, 1412, 1380, 1274, 1112, 1031, 817, 758 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data, see Tables 2 and 3; HMBC (acetone- d_6 , 500 MHz) H-2/C-1, C-4; H₂-3/C-1, C-2, C-4, C-4a; H-4a/C-4, C-5, C-8, C-8a; H-5/C-4, C-6, C-7; 5-OH/C-5, C-6; H-6/C-4a, C-7, C-8; H-7/C-5, C-6, C-8, C-8a; 8-OH/C-7, C-8; H-8a/C-1, C-2, C-4a, C-5; H-2'/C-1', C-4', C-8a'; H-3'/C-1', C-2', C-4a'; H-4'/C-2', C-4a', C-8', C-8a'; H-5'/C-1', C-4a', C-7', C-8a'; H-6'/C-4a', C-7', C-8'; H-7'/C-5', C-8', C-8a'; NOESY (acetone- d_6 , 500 MHz) H-2/2-OH, H-2/H₂-3, H-3 β /H-4a, H-4a/H-5, H-4a/H-8a, H-5/5-OH, H-5/H-6, H-5'/H-8a, H-6'/H-7, H-7'/H-8, H-8/8-OH, H-8/H-8a, H-2'/H-3', H-3'/H-4', H-5'/H-6', H-6'/H-7'; HRMS (ESI-TOF) m/z 377.0998 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{Na}$, 377.1001).

4.3.4. Palmarumycin P₄ (4**).** White powder; mp 124–126 °C; $[\alpha]_D^{24} -156.11$ (c 0.165, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 225 (4.78), 299 (4.16), 327 (3.78) nm; IR (film, CHCl_3) ν_{max} 3399, 2918, 1675, 1069, 1552, 1414, 1381, 1274, 1166, 1048, 822, 759 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data, see Tables 2 and 3; HMBC (acetone- d_6 , 500 MHz) H₂-3/C-1, C-2, C-4; H-5/C-4; H-6/C-4a, C-8; H-7/C-5, C-8, C-8a; H-8/C-4a, C-6, C-7; 8-OH/C-7, C-8; H-2'/C-1', C-4', C-8a'; H-3'/C-1', C-4a'; H-4'/C-2', C-4a', C-8', C-8a'; H-5'/C-1', C-4a', C-7', C-8a'; H-6'/C-4a', C-8'; H-7'/C-5', C-8', C-8a'; NOESY (acetone- d_6 , 500 MHz) H-2/2-OH, H-2/H₂-3, H-5/H-6, H-6'/H-7, H-7'/H-8, H-8/8-OH, H-8/H-8a, H-2'/H-3', H-3'/H-4', H-4'/H-5', H-5'/H-6', H-6'/H-7'; HRMS (ESI-TOF) m/z 359.0892 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{Na}$, 359.0890).

4.3.5. Palmarumycin P₅ (5**).** Yellow powder; mp 163–165 °C; $[\alpha]_D^{24} +2.64$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 224 (5.11), 256 (4.24), 299 (4.26), 327 (4.27) nm; IR (film, CHCl_3) ν_{max} 3430, 2921, 1652, 1413, 1358, 1264, 1107, 1074, 974, 750 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data, see Tables 2 and 3; HMBC (acetone- d_6 , 500 MHz) H-2/C-1, 2-OCH₃, C-4; H₂-3/C-1, C-2, C-4, C-4a; 5-OH/C-4a, C-5, C-6; H-6/C-4a, C-5, C-8; H-7/C-5, C-8a; H-8/C-1, C-4a, C-6, C-7; H-2'/C-1', C-4', C-8a'; H-3'/C-1', C-4a'; H-4'/C-2', C-4a', C-8a'; H-5'/C-4a', C-7', C-8a'; H-6'/C-4a', C-7', C-8'; H-7'/C-5', C-8a'; NOESY (acetone- d_6 , 500 MHz) H-2/2-OCH₃, H-2/H₂-3, H-6'/H-7, H-7'/H-8, H-2'/H-3', H-3'/H-4', H-5'/H-6', H-6'/H-7'; HRMS (ESI-TOF) m/z 371.0905 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{Na}$, 371.0890).

4.3.6. Palmarumycin CR₁ (11**).** White solid; mp 270–272 °C; $[\alpha]_D^{24} -12.57$ (c 0.2, MeOH); ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data were identical to those reported in the literature;⁷ NOESY (acetone- d_6 , 500 MHz) H₂-2/H₂-3, H-2 α /H-8a, H-2 α /4-OH, H-2 β /H-4, H₂-3/H-4, H-3 α /4-OH, H-3 β /H-4a, H-4/H-4a, H-4/4-OH, 4-OH/H-8a, H-4a/H-5, H-4a/8-OH, H-4a/H-8a, H-5/H-6, H-5/5-OH, H-5/H-8a, H-6/5-OH, H-6'/H-7, H-7'/H-8, H-8/8-OH, H-8/H-8a, H-2'/H-3', H-3'/H-4', H-5'/H-6', H-6'/H-7'.

4.4. Chemical transformation of palmarumycins CP₃ (**8**) to palmarumycins P₁ (**1**)

To a solution of **8** (10.5 mg, 31.4 μmol) in MeOH– CH_2Cl_2 (1:1, 2 mL) was added K₂CO₃ (ca. 10 mg). The resulting mixture was allowed to stir at room temperature for 3 h, and then concentrated by evaporation under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc (3 mL), washed with aq NaHCO₃ (1 M, 1 mL), and then H₂O (1 mL). The organic layer was concentrated in vacuo. The residue

(14.8 mg) was purified by silica gel chromatography (step gradient, elution with 0–10% MeOH in CH₂Cl₂) to give 10 fractions (1–10). Fraction 3 (2.1 mg) was further purified by Sephadex LH-20 column chromatography (elution with 100% MeOH) to provide 8 fractions (3-1–3-8). ¹H, ¹³C NMR and MS data of fraction 3-4 (0.4 mg) supported formation of **1**. This fraction contained about 40% of **1** by ¹H NMR integration (ca. 0.4 μmol, 1.4% yield).

4.5. Biological assays

Assay for activity against *Plasmodium falciparum* (K1, multi-drug resistant strain) was performed using the microculture radioisotope technique.¹⁷ Antibacterial activity against *Bacillus cereus* was evaluated using the resazurin microplate assay.¹⁸ Minimum inhibitory concentration (MIC) corresponding to 90% inhibition was determined. Green fluorescent protein-based assay was used to determine growth inhibition against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra and cytotoxicity against African green monkey kidney fibroblast (Vero) cells.¹⁹

Acknowledgements

This work was supported by National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) (Grant No. P-13-50383), and the Thailand Research Fund (Grant No. RSA5780060).

References and notes

- Cai, Y.-S.; Guo, Y.-W.; Krohn, K. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1840–1870.
- Hyde, K. D.; Jones, E. B. G.; Liu, J.-K.; Ariyawansa, H.; Boehm, E.; Boonmee, S.; Braun, U.; Chomnunti, P.; Crous, P. W.; Dai, D.-Q.; Diederich, P.; Dissanayake, A.; Doilom, M.; Doveri, F.; Hongsanan, S.; Jayawardena, R.; Lawrey, J. D.; Li, Y.-M.; Liu, Y.-X.; Lücking, R.; Monkai, J.; Muggia, L.; Nelsen, M. P.; Pang, K.-L.; Phookamsak, R.; Senanayake, I. C.; Shearer, C. A.; Suetrong, S.; Tanaka, K.; Thambugala, K. M.; Wijayawardene, N. N.; Wikee, S.; Wu, H.-X.; Zhang, Y.; Aguirre-Hudson, B.; Alias, S. A.; Aptroot, A.; Bahkali, A. H.; Bezerra, J. L.; Bhat, D. J.; Camporesi, E.; Chukeatirote, E.; Gueidan, C.; Hawksworth, D. L.; Hirayama, K.; De Hoog, S.; Kang, J.-C.; Knudsen, K.; Li, W.-J.; Li, X.-H.; Liu, Z.-Y.; Mapook, A.; McKenzie, E. H. C.; Miller, A. N.; Mortimer, P. E.; Phillips, A. J. L.; Raja, H. A.; Scheuer, C.; Schumm, F.; Taylor, J. E.; Tian, Q.; Tibpromma, S.; Wanasinghe, D. N.; Wang, Y.; Xu, J.-C.; Yacharoen, S.; Yan, J.-Y.; Zhan, M. *Fungal Divers.* **2013**, *63*, 1–313.
- Jiao, P.; Swenson, D. C.; Gloer, J. B.; Campbell, J.; Shearer, C. A. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1667–1671.
- Krohn, K.; Michel, A.; Flörke, U.; Aust, H.-J.; Draeger, S.; Schulz, B. *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 1093–1097.
- Bringmann, G.; Busemann, S.; Krohn, K.; Beckmann, K. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 1655–1664.
- Martínez-Luis, S.; Della-Togna, G.; Coley, P. D.; Kursar, T. A.; Gerwick, W. H.; Cubilla-Rios, L. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 2011–2014.
- Wipf, P.; Lynch, S. M.; Birmingham, A.; Tamayo, G.; Jiménez, A.; Campos, N.; Powis, G. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1651–1658.
- Dai, J.; Krohn, K.; Elsässer, B.; Flörke, U.; Draeger, S.; Schulz, B.; Pescitelli, G.; Salvadori, P.; Antus, S.; Kurtán, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 4845–4854.
- Krohn, K.; Beckmann, K.; Aust, H.-J.; Draeger, S.; Schulz, B.; Busemann, S.; Bringmann, G. *Liebigs Ann.-Recl.* **1997**, 2531–2534.
- Ravindranath, N.; Reddy, M. R.; Mahender, G.; Ramu, R.; Kumar, K. R.; Das, B. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2387–2390.
- Wijayawardene, N. N.; Crous, P. W.; Kirk, P. M.; Hawksworth, D. L.; Boonmee, S.; Braun, U.; Dai, D.-Q.; D'souza, M. J.; Diederich, P.; Dissanayake, A.; Doilom, M.; Hongsanan, S.; Jones, E. B. G.; Groenewald, J. Z.; Jayawardena, R.; Lawrey, J. D.; Liu, J.-K.; Lücking, R.; Madrid, H.; Manamgoda, D. S.; Muggia, L.; Nelsen, M. P.; Phookamsak, R.; Suetrong, S.; Tanaka, K.; Thambugala, K. M.; Wanasinghe, D. N.; Wikee, S.; Zhang, Y.; Aptroot, A.; Ariyawansa, H. A.; Bahkali, A. H.; Bhat, D. J.; Gueidan, C.; Chomnunti, P.; De Hoog, G. S.; Knudsen, K.; Li, W.-J.; McKenzie, E. H. C.; Miller, A. N.; Phillips, A. J. L.; Piątek, M.; Raja, H. A.; Shivas, R. S.; Slippers, B.; Taylor, J. E.; Tian, Q.; Wang, Y.; Woudenberg, J. H. C.; Cai, L.; Jaklitsch, W. M.; Hyde, K. D. *Fungal Divers.* **2014**, *69*, 1–55.
- Sakayaroj, J.; Pang, K.-L.; Jones, E. B. G. *Fungal Divers.* **2011**, *46*, 87–109.
- (a) Bunyard, B. A.; Nicholson, M. S.; Royse, D. J. *Mycologia* **1994**, *86*, 762–772; (b) Landvik, S. *Mycol. Res.* **1996**, *100*, 199–202; (c) White, T. J.; Bruns, T. D.; Lee, S.; Taylor, J. W. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*; Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J., Eds.; Academic: San Diego, CA, 1990; pp 315–322.
- Hall, T. A. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.
- Swofford, D. L. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods) Version 4.0b10*; Sinauer, Sunderland, 2002.
- Suetrong, S.; Schoch, C. L.; Spatafora, J. W.; Kohlmeyer, J.; Volkmann-Kohlmeyer, B.; Sakayaroj, J.; Phongpaichit, S.; Tanaka, K.; Hirayama, K.; Jones, E. B. G. *Stud. Mycol.* **2009**, *64*, 155–173.
- Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710–718.
- Sarker, S. D.; Nahar, L.; Kumarasamy, Y. *Methods* **2007**, *42*, 321–324.
- Changsen, C.; Franzblau, S. G.; Palittapongarnpim, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3682–3687.

ภาคผนวก ข. ผลงานตีพิมพ์ในหัวข้อเรื่อง “A pyrone, naphthoquinone, and cyclic urea from the marine-derived fungus *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335” ในวารสารนานาชาติ “Tetrahedron Letters” ปี 2016 ฉบับที่ 57 หน้า 1171-1173



Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tetlet

A pyrone, naphthoquinone, and cyclic urea from the marine-derived fungus *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335



Supichar Chokpaiboon^a, Panida Unagul^b, Surisa Kongthong^b, Kannawat Danwisetkanjana^b,
Apiradee Pilantanapak^c, Satinee Suetrong^b, Taridaporn Bunyapaiboonsri^{b,*}

^a Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^b National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Thailand Science Park, Phahonyothin Road, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand

^c Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 December 2015

Revised 29 January 2016

Accepted 1 February 2016

Available online 2 February 2016

Keywords:

Marine-derived fungus

Astrosphaeriella nypae

Pyrone

Naphthoquinone

Cyclic urea

ABSTRACT

The novel compounds, astronypyrone, astronyquinone, and astronyurea, together with three known compounds, xestodecalactone A, ent-coryoctalactone B, and dimethoxy-O-methylpulvinone were isolated from the marine-derived fungus *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335. Their structures were elucidated on the basis of NMR spectroscopy and mass spectrometry data. Astronypyrone possesses a 2-pyrone derivative fused with a tetrahydrofuran moiety via a dihydropyran unit, while the 2-pyrone ring is substituted by a naphthoquinone skeleton in astronyquinone.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Fungi in Pleosporales (the largest order in the fungal class Dothideomycetes) have been reported to produce various secondary metabolites, for example: naphthoquinone spiroketals,¹ spiroacetones,² nonadrides,³ phthalides,⁴ terpenoids,⁵ and polyketides.⁶ *Astrosphaeriella* is a fungal genus belonging to this order. It contains approximately 61 species,⁷ and can be found in different habitats, such as terrestrial palm, bamboo, stout grass, freshwater, and intertidal regions.⁸ Secondary metabolites produced from the genus *Astrosphaeriella* have been scarcely explored. To the best of our knowledge, only three new naphthoquinones (astropaquinones A–C) and a known 6-hydroxy-2,4-dimethoxy-7-methylanthraquinone have been reported from *Astrosphaeriella papuana*.⁹ As part of our ongoing research on novel bioactive compounds from fungi, *Astrosphaeriella nypae* BCC 5335 was isolated from *Nypa fruticans*, a brackish water palm, collected at the Samut Prakan Province, Thailand. The study of the large scale fermentation of this fungus led to the isolation and elucidation of the structure of astronypyrone, astronyquinone, and astronyurea [a new pyrone, naphthoquinone, and cyclic urea respectively (1–3)] together with three known compounds, xestodecalactone A (4),^{10,11} ent-coryoctalactone B (5),¹² and dimethoxy-O-methylpulvinone (6).¹³

Fractionation of the EtOAc extract from the culture medium of BCC 5335, utilizing Sephadex LH-20 column chromatography, provided 11 fractions. Fraction 2 was subsequently purified by silica gel column chromatography and reversed-phase HPLC to afford 1. Fraction 4 was purified by Sephadex LH-20 column chromatography and reversed-phase HPLC to afford 2–5. Compound 6 was obtained from the crude extract of the culture mycelia after purification by Sephadex LH-20 column chromatography and reversed-phase HPLC.

Astronypyrone (1)¹⁴ was isolated as a yellow–brown solid with a molecular formula of C₁₉H₂₂O₅ as established by HRESIMS. Its ¹³C NMR and DEPT spectra (Table 1) revealed resonances of a conjugated aldehyde (δ_C 192.3), two ester carbonyl/quaternary sp² oxy-carbons (δ_C 163.2 and 160.4), four olefinic/aromatic methine carbons (δ_C 159.9, 149.3, 129.8, and 128.8), four quaternary sp²/hemiacetal carbons (δ_C 134.4, 109.8, 108.9, and 96.8), an oxymethylene (δ_C 72.1), two methines (δ_C 45.8 and 44.8), two methylenes (δ_C 23.4 and 18.5), and three methyl groups (δ_C 21.7, 17.4, and 12.4). Analysis of the 2D NMR data of 1 indicated a similar core structure to that of the known penicypyrone, previously described from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F44.¹⁵ The differences were the presence of a *trans*-2-pentenal at C-11 and the lack of a methyl group at C-12 in 1 when compared to penicypyrone. The *trans*-2-pentenal unit was deduced from the

* Corresponding author. Tel.: +66 2 564 6700x3553; fax: +66 2 564 6707.

E-mail address: taridaporn@biotec.or.th (T. Bunyapaiboonsri).

Table 1NMR spectroscopic data of **1**, **3** [^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz)], and **2** [^1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz)] in acetone- d_6

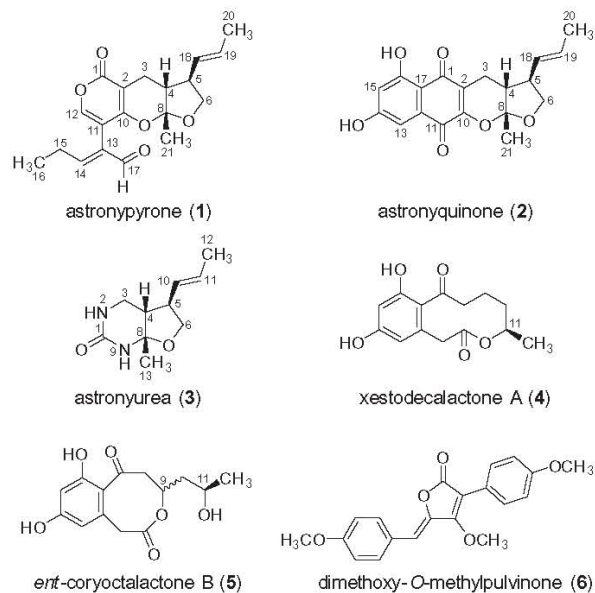
Position	1		2		3	
	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C}
1		163.2		189.1		155.6
2		96.8		116.7		
3	2.53, m	18.5	2.75, dd (19.4)	17.6	3.31, ddd (12.6, 3.4, 2.9)	37.3
4	2.25, ddd (11.4, 5.2, 2.6)	45.8	2.61, dd (19.4, 6.6)		3.07, ddd (12.6, 5.0, 1.9)	
5	2.60, dq (11.4, 8.7)	44.8	2.30, dd (11.6, 6.6)	45.2	1.98, ddd (9.5, 3.4, 1.9)	48.5
6	4.01, dd (8.7, 8.6)	72.1	2.71, dq (11.6, 8.6)	44.8	2.99, dddd (9.5, 8.8, 8.5, 8.3)	45.0
	3.65, dd (8.7, 8.6)		4.11, dd (8.7, 8.6)	72.0	3.93, dd (8.4, 8.3)	70.3
			3.70, dd (8.7, 8.6)		3.47, dd (8.5, 8.4)	
8		109.8		109.8		91.3
10		160.4		153.4	5.39, ddq (15.1, 8.8, 1.5)	131.0
11		108.9		178.1	5.57, ddq (15.1, 0.6, 6.4)	127.2
12	7.35, s	149.3		133.4	1.66, dd (6.4, 1.5)	17.1
13		134.4	7.03, d (1.6)	107.5 ^a	1.46, s	27.0
14	7.03, t (7.6)	159.9		163.6 ^b		
15	2.37, quin (7.6)	23.4	6.58, d (1.6)	107.6 ^a		
16	1.11, t (7.6)	12.4		163.3 ^b		
17	9.54, s	192.3		107.9		
18	5.35, ddq (15.1, 8.7, 1.5)	129.8	5.37, dd (15.1, 8.6)	129.4		
19	5.56, dq (15.1, 6.4)	128.8	5.58, dq (15.1, 6.4)	128.8		
20	1.67, dd (6.4, 1.5)	17.4	1.67, d (6.4)	17.1		
21	1.44, s	21.7	1.54, s	21.7		
16-OH					5.69, br s	
NH					5.66, br s	

^{a,b} Interchangeable signals.

$\text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--CH}$ system, HMBC correlations from the olefinic proton H-14 (δ_{H} 7.03, t, $J = 7.6$ Hz) to the aldehyde carbon (δ_{C} 192.3, C-17), and a NOESY cross peak between H-14 and the aldehyde proton H-17 (δ_{H} 9.54, s). The sp^2 methine proton H-12 (δ_{H} 7.35, s) showed HMBC correlations with C-1, C-10, C-11, and C-13. Selected COSY and HMBC correlations supported the planar structure of **1** as shown in Figure 2. A NOESY correlation between H-4 and H₃-21 suggested a *cis*-ring junction between the tetrahydrofuran and dihydropyran moieties. The large coupling constant, $J_{\text{H-4,H-5}}$ of 11.4 Hz, and a strong NOESY correlation between H-4 and H-18 indicated that the *trans*-propenyl unit and proton H-4 were on the same face. Therefore, the relative configuration of **1** was proposed as depicted in Figure 1.

Astronyquinone (**2**)¹⁶ was obtained as an orange solid. Its HRESIMS displayed a $[\text{M}+\text{Na}]^+$ peak at m/z 365.0997, indicating a molecular formula of $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6$. The absorption bands at 1671, 1635, and 1615 cm^{-1} in the IR spectrum, and an absorption maxima at 441 nm in the UV spectrum suggested the presence of a 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone derivative. Analysis of the 2D NMR data of **2** revealed a similar tetrahydrofuran–dihydropyran subunit to **1**, while the 2-pyrone moiety of **1** was substituted by a 5,7-dihydroxy-1,4-naphthoquinone in **2**. The ^1H NMR spectrum displayed signals of two *meta*-coupled aromatic protons [δ_{H} 7.03 (d, $J = 1.6$ Hz, H-13) and 6.58 (d, $J = 1.6$ Hz, H-15)], and one chelated hydroxyl proton [δ_{H} 12.51 (s, C-16-OH)] for the naphthoquinone moiety. The chelated hydroxyl proton (C-16-OH) showed HMBC correlations with three aromatic carbons (C-15, C-16, and C-17). HMBC correlations observed from the upfield aromatic proton H-13 to C-14, C-15, C-17, and the quinone carbonyl at δ_{C} 178.1 (C-11); and from H₂-3 to C-10 and the other quinone carbonyl at δ_{C} 189.1 (C-1) indicated the presence of a 5,7-dihydroxy-1,4-naphthoquinone moiety and the planar structure of **2** (Fig. 2). The relative configuration of **2** was assigned based on NOESY experiments and $^3J_{\text{H-H}}$ coupling constants in the same manner as described for **1**.

Astronyurea (**3**)¹⁷ was obtained as a yellow–brown amorphous solid with a molecular formula of $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ as established by

**Figure 1.** Structures of compounds **1–6**.

HRESIMS. The intense IR absorption bands at 3250, 1698 cm^{-1} , together with the observation of an upfield carbonyl signal (δ_{C} 155.6, C-1) in the ^{13}C NMR spectrum and two labile protons (δ_{H} 5.69 and 5.66, NH) in the ^1H NMR spectrum suggested the presence of a urea functionality. The resonance of the hemiaminal C-8 (δ_{C} 91.3) for **3** was shifted upfield when compared to the acetal carbons of **1** and **2** (δ_{C} 109.8, C-8), supporting the replacement of an oxygen by a nitrogen atom. The downfield signal of $\text{CH}_2\text{--}3$ (δ_{H} 3.31 and 3.07) due to attachment to a nitrogen showed a HMBC correlation to the urea carbonyl C-1 (Fig. 2). The coupling constant,

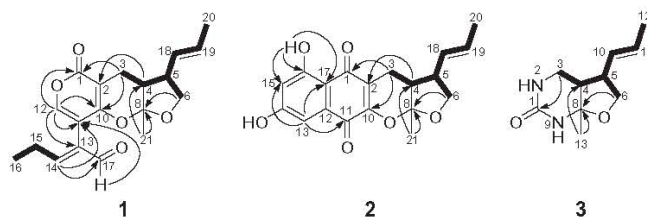


Figure 2. COSY (in bold) and key HMBC correlations for 1–3.

$^3J_{\text{H-4,H-5}}$ of 9.5 Hz, and NOESY correlations from H-4 to H₃-13, and from H-4 to H-10 suggested the relative configuration of 3.

Compounds 4 and 6 were identified as xestodecalactone A and dimethoxy-*O*-methylpulvinone, respectively, based on spectroscopic analyses and data comparisons with those reported in the literature.^{10,11,13} The NMR spectroscopic data of 5 were consistent with those of coryoctalactone B,¹² however the sign of specific rotation was opposite ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} +50.4$, c 0.10, MeOH for 5; and $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -32$, c 0.025, MeOH for coryoctalactone B¹²). Therefore, compound 5 was assigned as *ent*-coryoctalactone B, and suggested to possess the C-11(*R*) configuration in accordance with it sharing a similar polyketide biosynthetic origin with compound 4.

Antimalarial, antituberculosis, and cytotoxic activities were evaluated in biological assays for compounds 2, 4, and 6. Antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* K1 was observed for compounds 6 with an IC_{50} value of 5.7 $\mu\text{g/mL}$. Compound 2 showed weak antituberculosis activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra with a MIC value of 50 $\mu\text{g/mL}$, and exhibited cytotoxic activity against Vero (African green monkey kidney fibroblast) cell lines with an IC_{50} value of 17.4 $\mu\text{g/mL}$. Compound 4 was found to be inactive in all assays.

Acknowledgments

S. Chokpaiboon thanks the Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST) for PhD scholarship (Grant No. TGIST 01-53-011). This work was supported by National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), and the Thailand Research Fund (Grant No. RSA5780060).

Supplementary data

Supplementary data (experimental procedures ^1H and ^{13}C NMR spectra for 1–3) associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.02.002>.

References and notes

- Macías-Rubalcava, M. L.; Hernández-Bautista, B. E.; Jiménez-Estrada, M.; González, M. C.; Glenn, A. E.; Hanlin, R. T.; Hernández-Ortega, S.; Saucedo-García, A.; Muria-González, J. M.; Anaya, A. L. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1185–1196.
- Abdel-Wahab, M. A.; Asolkar, R. N.; Inderbitzin, P.; Fenical, W. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1212–1218.
- Hosoe, T.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; Raja, H. A.; Shearer, C. A. *Heterocycles* **2010**, *81*, 2123–2130.
- Prachyawarakorn, V.; Mahidol, C.; Sureram, S.; Sangpetsiripan, S.; Wiyakrutta, S.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P. *Planta Med.* **2008**, *74*, 69–72.
- Shiono, Y.; Kikuchi, M.; Koseki, T.; Murayama, T.; Kwon, E.; Aburai, N.; Kimura, K. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1400–1405.
- (a) Leyte-Lugo, M.; Figueroa, M.; González, M. C.; Glenn, A. E.; González-Andrade, M.; Mata, R. *Phytochemistry* **2013**, *96*, 273–278; (b) Ayers, S.; Graf, T. N.; Adcock, A. F.; Kroll, D. J.; Shen, Q.; Swanson, S. M.; Wani, M. C.; Darveaux, B. A.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 5128–5130.
- Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>), accessed December 3, 2015.
- Liu, J.-K.; Phookamsak, R.; Jones, E. B. G.; Zhang, Y.; Ko-Ko, T. W.; Hu, H.-L.; Boonmee, S.; Doilom, M.; Chukeatiroe, E.; Bahkali, A. H.; Wang, Y.; Hyde, K. D. *Fungal Divers.* **2011**, *51*, 135–154.
- Wang, L.; Dong, J. Y.; Song, H.-C.; Shen, K. Z.; Wang, L. M.; Sun, R.; Wang, C. R.; Gao, Y. X.; Li, G. H.; Li, L.; Zhang, K. Q. *Planta Med.* **2009**, *75*, 1339–1343.
- Edrada, R. A.; Heubes, M.; Brauers, G.; Wray, V.; Berg, A.; Gräfe, U.; Wohlfarth, M.; Mühlbacher, J.; Schaumann, K.; Sudarsono, H.; Bringmann, G.; Proksch, P. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1598–1604.
- Yoshino, T.; Ng, F.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14185–14191.
- Ebrahim, W.; Aly, A. H.; Wray, V.; Proksch, P.; Debbab, A. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 6611–6614.
- Ojima, N.; Takenaka, S.; Seto, S. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 2527–2529.
- Astronpyrone* (1): Yellow–brown solid; mp 196–198 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -42.8$ (c 0.10, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 216 (3.33), 289 (3.17) nm; IR (ATR) ν_{max} 2938, 1708, 1648, 1380, 1052 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; HRMS (ESI-TOF) m/z 353.1352 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{Na}$, 353.1359).
- Trisuwan, K.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 1100–1102.
- Astronyquinone* (2): Orange solid; mp 194–196 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -54.4$ (c 0.10, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 214 (4.52), 265 (4.29), 305 (4.03), 441 (3.43) nm; IR (ATR) ν_{max} 3327, 2922, 1671, 1635, 1615, 1404, 1323, 1092, 982, 856, 779 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; HRMS (ESI-TOF) m/z 365.0997 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{Na}$, 365.0996).
- Astronyurea* (3): Yellow–brown amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -69.0$ (c 0.10, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 285 (2.60) nm; IR (ATR) ν_{max} 3250, 2936, 1698, 1644, 1509, 1348, 1154, 1024, 778 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; HRMS (ESI-TOF) m/z 219.1101 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$, 219.1104).

ภาคผนวก ค. ผลงานตีพิมพ์ในหัวข้อเรื่อง “Trichothecenes from the Fungus *Acremonium crotocinigenum* BCC 20012” ในวารสารนานาชาติ “Phytochemistry Letters” ปี 2016 ฉบับที่ 18 หน้า 39-43



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytol

Trichothecenes from the fungus *Acremonium crotonigenum* BCC 20012



Taridaporn Bunyapaiboonsri*, Seangaroon Yoiprommarat, Sanisa Lapanun, Upin Balram, Rungtiwa Chanthaket, Anupong Klayuban, Satinee Suetrong

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Pathum Thani 12120, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 May 2016

Received in revised form 17 August 2016

Accepted 26 August 2016

Available online xxx

Keywords:

Trichothecene

Mycotoxin

Acremonium crotonigenum

Antimalarial activity

Cytotoxic activity

ABSTRACT

Two new trichothecenes (**1** and **2**) and a new chloroderivative of a trichothecene analogue (**3**) together with four known trichothecenes, crotonin, trichothecin, 8-deoxytrichothecinol B, and a trichothecene analogue, were isolated from the fungus *Acremonium crotonigenum* BCC 20012. The structures of these compounds were elucidated by extensive spectroscopic analysis. Among the tested metabolites, trichothecin itself showed strongest antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* K1, and cytotoxic activity against Vero cell lines with IC₅₀ values of 0.05 and 0.13 µg/mL, respectively.

© 2016 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Trichothecenes are a large group of mycotoxins produced by various fungal genera including *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Stachybotrys*, *Verticimonosporium*, *Cylindrocarpum*, and *Acremonium* (*Cephalosporium*) (Bräse et al., 2009). They possess tetracyclic sesquiterpene core structure that includes a 12, 13-epoxy ring. Trichothecenes have been known as specific inhibitor of eukaryotic protein synthesis, causing toxicity to animals and humans fed with contaminated food or grain crops (McCormick et al., 2011). Apart from the toxicity effect, several trichothecenes have been found to exhibit other biological activities including antitumor (Amagata et al., 2003), antimalarial (Isaka et al., 1999; Waterman et al., 2014), and antiviral activities (Tani et al., 1995; García et al., 2002). In our ongoing research on novel bioactive compounds from fungi, chemical investigation of the fungus *Acremonium crotonigenum* BCC 20012 resulted in the isolation and structure elucidation of two new trichothecenes, 7-dehydro-8-dehydroxytrichothecinol B (**1**) and 8-deoxy-16-hydroxytrichothecinol B (**2**), and a new chloroderivative of a trichothecene analogue (**3**) (Fig. 1), together with four known trichothecenes including crotonin (**4**) (Gyimesi and Melera, 1967; Avent et al., 1988), trichothecin (**5**) (Freeman and Morrison,

1948; Hanson et al., 1974; Loukaci et al., 2000), 8-deoxytrichothecinol B (**6**) (Plattner et al., 1988; Chinworrungsee et al., 2008), and a trichothecene analogue (**7**) (Sy-Cordero et al., 2011).

2. Results and discussion

The fungus BCC 20012 was isolated from petiole of the brackish water palm, *Nypa fruticans*, collected at Mu Ko Chang National Park, Trat province, Thailand. Phylogenetic analysis based on the internal transcribed spacer (ITS) region of the nuclear ribosomal DNA indicated that BCC 20012 was identified as *Acremonium crotonigenum*. Its crude EtOAc extract of the whole liquid culture in small-scale fermentation showed antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* K1 with an IC₅₀ value of 0.65 µg/mL. Subsequent purification of the crude EtOAc extract from the large-scale culture broth, using Sephadex LH-20 column chromatography and reversed phase HPLC, led to the isolation of compounds **1**–**7**.

Compound **1** had a molecular formula of C₁₉H₂₄O₄ as deduced from the quasimolecular ion peak at *m/z* 339.1560 in the HRESIMS. The ¹³C NMR and DEPT spectra displayed signals of one conjugated ester carbonyl (δ_C 165.6), five sp² methines (δ_C 145.1, 133.0, 125.4, 120.4, and 117.9), one quaternary sp² carbon (δ_C 134.1), three oxymethines (δ_C 77.6, 74.1, and 69.9), one quaternary oxycarbon (δ_C 66.3), two quaternary carbons (δ_C 47.5 and 44.2), two methylenes (δ_C 45.9 and 36.7), and four methyl groups (δ_C 20.3, 16.0, 14.6, and 5.4). Analysis of 2D NMR data of **1** revealed a similar trichothecene

* Corresponding author.

E-mail address: taridaporn@biotec.or.th (T. Bunyapaiboonsri).

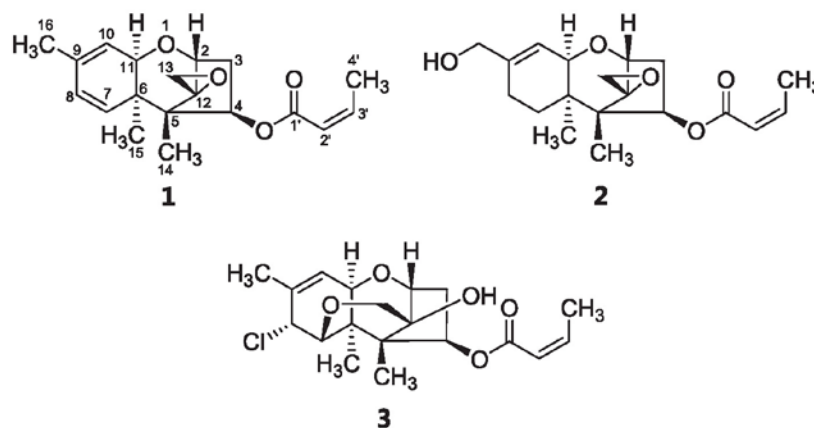
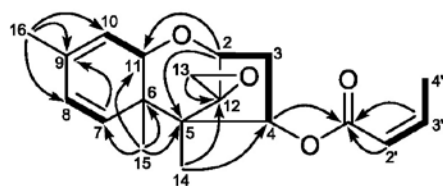
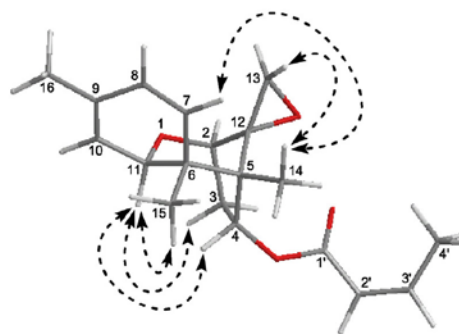


Fig. 1. Structures of compounds 1–3.

core structure to 8-deoxytrichothecinol B (**6**), with only the exception that the two methylenes (δ_C 24.5/ δ_H 1.43 (m) and 1.90–2.07 (m), CH₂-7; δ_C 28.0/ δ_H 1.90–2.07 (m), CH₂-8) of **6** (Chinworrungsee et al., 2008) were replaced by two sp^2 methines [δ_C 133.0/ δ_H 5.97 (dd, $J=9.8, 1.4$ Hz), CH-7; δ_C 125.4/ δ_H 5.81 (dd, $J=9.8, 1.5$ Hz), CH-8] for **1**. The olefinic proton H-7 showed HMBC correlations with C-5, C-9, and C-11, while H-8 has HMBC correlations with C-6, C-10, and C-16. COSY and selected HMBC correlations as shown in Fig. 2 supported the planar structure of **1**. Key NOESY correlations observed between H-3 α /H-11, H-4/H-11, H-4/H₃-15, H-7/H₃-14, H-11/H₃-15, and H-13 β /H₃-14 confirmed the relative stereochemistry (Fig. 3), which was similar to other known trichothecenes (Bräse et al., 2009; Fruhmman et al., 2014).

Compound **2** had a molecular formula of C₁₉H₂₆O₅, indicating one additional oxygen atom as compared to that of compound **6**. Extensive inspection of their NMR data revealed close structural similarity, with only the difference that the methyl group (δ_C 23.3/ δ_H 1.72 (s), CH₃-16) of **6** (Chinworrungsee et al., 2008) was substituted by the hydroxy methyl for **2** [δ_C 65.0/ δ_H 3.95 (br m), CH₂-16; and δ_H 3.85 (br m), 16-OH]. The olefinic proton H-10 showed HMBC correlation with C-16. NOESY correlations were observed in the same manner as compound **1**, with only the exception that NOESY cross peak between H-7 and H₃-14 of **1** was replaced by NOESY cross signal between H-7 α and H₃-14 for **2**.

Compound **3** was isolated as colorless film. Its HRESIMS exhibited the [M+Na]⁺ peak at m/z 391.1309 and 393.1310 in the ratio approx. 3:1, indicating the presence of a chlorine atom and a molecular formula of C₁₉H₂₅ClO₅. Analysis of its NMR data revealed a close similarity to those of the known trichothecin analogue (**7**) (Sy-Cordero et al., 2011). However, the methine carbon signal of C-8 for **3** was shifted up field (δ_C 59.7) and its proton signal [δ_H 4.28 (br s)] was shifted down field comparable to those of **7** [δ_C 77.0/ δ_H 3.83 (br s)] (Sy-Cordero et al., 2011). Therefore, from the MS and NMR data, a chlorine atom was suggested to attach at C-8 for **3** instead of the hydroxy group in **7**. The methine proton H-8 of **3**

Fig. 2. COSY (in bold) and key HMBC correlations for **1**.Fig. 3. Selected NOESY correlations for **1**.

showed HMBC correlation with C-6, C-7, C-9, C-10, and C-16. The $^2J_{H-H}$ coupling constant of 11.5 Hz between H-13 α and H-13 β (comparable to that of **1** and **2**, $^2J_{H-13\alpha, H-13\beta} = 4.1$ Hz), and HMBC correlation from H-13 α to C-7 supported the tetrahydropyran ring instead of the 12, 13-epoxy ring as found in usual trichothecenes. The relative configuration was established from key NOESY correlations as shown in Fig. 4. NOESY cross peak between H-8 and H₃-15 has not been observed, therefore the proton H-8 was assigned to be in the β - and equatorial position.

Spectroscopic data of **4**–**7** were consistent with those reported in the literature for the known crotoxin (**4**) (Gyimesi and Melera, 1967; Avent et al., 1988), trichothecin (**5**) (Hanson et al., 1974; Loukaci et al., 2000), 8-deoxytrichothecinol B (**6**) (Plattner et al., 1988; Chinworrungsee et al., 2008), and a trichothecene analogue (**7**) (Sy-Cordero et al., 2011). The relative configuration of **7** which had been previously described (Sy-Cordero et al., 2011), was revised as depicted (Fig. 5) on the basis of NOESY correlations in the same manner as compound **3**.

Proposed biosynthetic pathway along with certain related genes encoding enzymatic steps had been described for the known *Fusarium* trichothecenes, such as nivalenol and T-2 toxin (McCormick et al., 2011). However, for trichothecin (**5**) which lack the hydroxyl group at C-3, only a few genes or enzymes had been characterized. 12, 13-epoxytrichothec-9-ene (EPT) had been suggested as a precursor for trichothecin (**5**) via compound **6** (McCormick et al., 2011). Compound **2** may derived from **6** by C-16 hydroxylation. C-7 or C-8 hydroxylation of **6**, and subsequently dehydration could provide **1**. Epoxidation of **1**, followed by

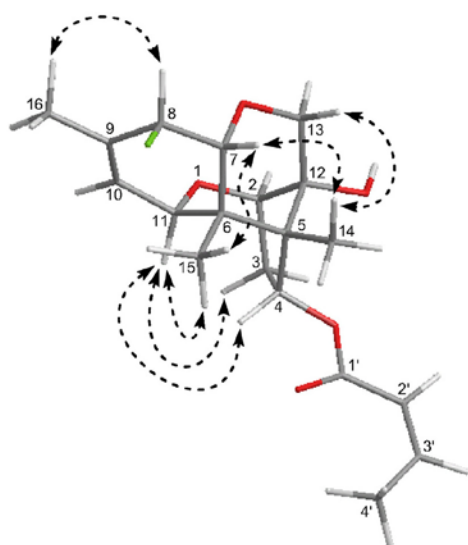


Fig. 4. Selected NOESY correlations for **3**.

nucleophilic attack of chloride or hydroxide ion to 7, 8-epoxy ring might lead to the formation of compound **3** or **7**, respectively (Fig. 5).

Antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* K1 was evaluated for compounds **1**, **4**, **5**, and **7** (Table 2). Among these metabolites, trichothecin (**5**) showed strongest antimalarial activity with IC_{50} value of $0.05 \mu\text{g/mL}$, and displayed cytotoxic activity against Vero cell lines with IC_{50} value of $0.13 \mu\text{g/mL}$. Crotochin (**4**) and compound **1** were approximately 5 and 65 times less active against *P. falciparum* K1 than trichothecin (**5**).

Compound **7** was inactive at $10 \mu\text{g/mL}$ against *P. falciparum* K1, and non-cytotoxic at $50 \mu\text{g/mL}$. Therefore, it is possible to conclude that the C12–C13 epoxy ring is essential and responsible for antimalarial activity, and especially cytotoxicity as described in the literature (Amagata et al., 2003; Bräse et al., 2009).

3. Conclusion

In this study, two new trichothecenes (**1** and **2**) and a new chloroderivative of a trichothecene analogue (**3**) together with four known trichothecenes, crotochin (**4**), trichothecin (**5**), 8-deoxytrichothecinol B (**6**), and a trichothecene analogue (**7**) were isolated from the fungus *Acremonium crotochinigenum* BCC 20012. Crotochin (**4**) had been previously reported from *Acremonium* (*Cephalosporium*) *crotochinigenum* (Gyimesi and Melera, 1967). Trichothecin (**5**), 8-deoxytrichothecinol B (**6**), and a trichothecene analogue (**7**) had been described from *Trichothecium roseum* (Freeman and Morrison, 1948; Iida et al., 1996); *Trichothecium roseum* (Plattner et al., 1988) and *Spicellum roseum* (Langley et al., 1990; Tanaka et al., 2001); and *Trichothecium* sp. (Sy-Cordero et al., 2011), respectively. All these fungi belong to the same order Hypocreales. Due to limitation of the existing phylogenetic database and uncertain taxonomic position in this order, their families are therefore *incertae sedis*. Accordingly, taxonomic assignment for some of these fungi might have to be revised in the future.

4. Experimental

4.1. General experimental procedures

Optical rotations were determined using a JASCO P-1030 digital polarimeter. IR spectra were taken on a Bruker VECTOR 22 spectrometer. NMR spectra were taken on a Bruker DRX 400 and a Bruker AV500D spectrometers. ESI-TOF mass spectra were recorded on a Bruker microTOF mass spectrometer.

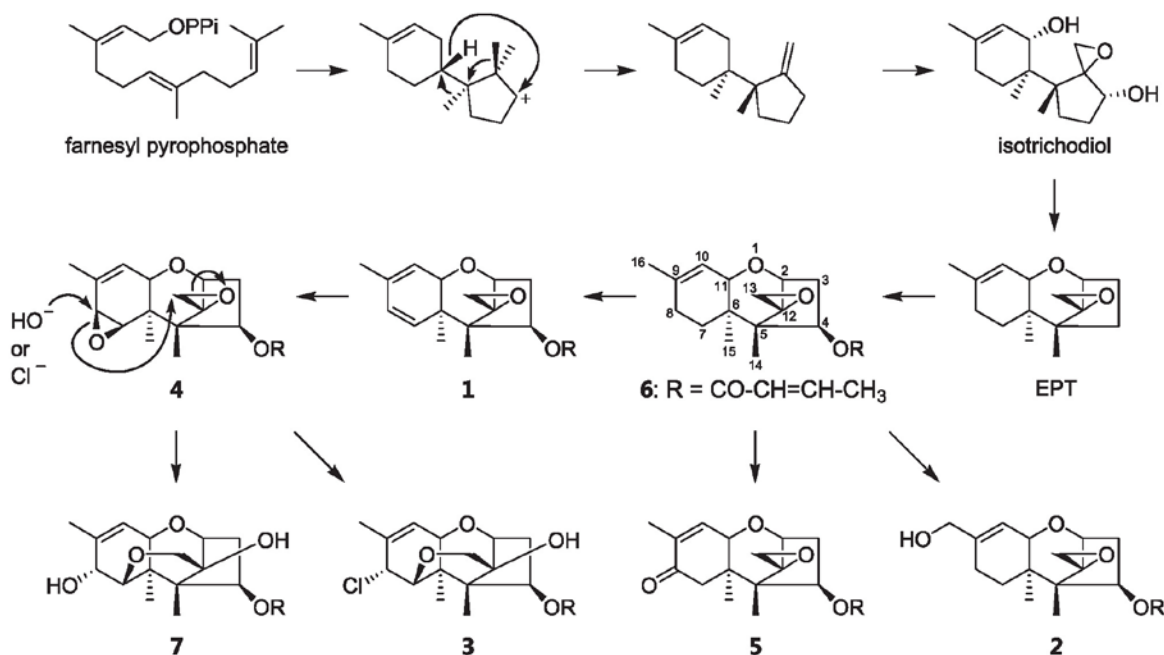


Fig. 5. Proposed biosynthetic pathway for **6** and possible chemical conversion from **6** to compounds **1–5** and **7**.

4.2. Fungal material

The fungus was isolated from petiole of the brackish water palm, *Nypa fruticans*, which was collected at Mu Ko Chang National Park, Trat province, Thailand, by Prof. Dr. E.B. Gareth Jones. The fungus was deposited at the BIOTEC Culture Collection as BCC 20012 on September 2, 2006. Genomic DNA was extracted from actively growing mycelia using a modification of the CTAB method (Doyle and Doyle, 1987). The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified using the primer pair ITS5/ITS4 (White et al., 1990), and sequenced by Macrogen Inc, Korea. Sequence homologies were analyzed using BLAST (Altschul et al., 1990). BLAST search result based on ITS region revealed that the BCC 20012 was identified as *Acremonium crotocinigenum* (family *Incertae sedis*, order Hypocreales, subclass Hypocreomycetidae, class Sordariomycetes and phylum Ascomycota). The fungus sequence was submitted to GenBank with accession number KX153189.

4.3. Fermentation, extraction, and isolation

BCC 20012 was maintained on potato dextrose agar (PDA) at 25 °C. The agar blocks (8 × 1 cm²) were finely chopped and transferred into Erlenmeyer flasks (8 × 250 mL), each containing 25 mL of potato dextrose broth (PDB). After incubation on a rotary shaker (200 rpm) for 5 days, the primary seed culture (8 × 25 mL) was transferred into Erlenmeyer flasks (8 × 1 L), each containing 250 mL of PDB, then fermented on a rotary shaker (200 rpm) for 5 days. The secondary seed culture (80 × 25 mL) was subsequently transferred into Erlenmeyer flasks (80 × 1 L), each containing 250 mL of culture medium composing of glucose 10 g, corn steep 10 g, KH₂PO₄ 0.5 g and MgSO₄·7H₂O 0.5 g in 1 L of distilled water. After incubation at 25 °C for 34 days on static condition, the culture was filtered to separate broth and mycelia. The culture broth was extracted three times with an equal volume of EtOAc (3 × 20 L). The organic layer was concentrated under reduced pressure to obtain a dark brown gum (4.37 g). The crude extract was fractionated by Sephadex LH-20 column chromatography (elution with 100% MeOH) to provide 9 fractions (1–9). Fraction 6 (1.53 g) was subjected to a Sephadex LH-20 column chromatography to afford 6

fractions (6-1–6-6). Fraction 6-4 (462.1 mg) was purified by preparative HPLC using a reversed-phase column (SunFire C18 column, 19 × 250 mm, 10 μm; flow rate 15 mL/min) and a linear gradient of MeCN:H₂O (20:80 → 80:20) over 25 min to yield **7** (12.4 mg, *t_R* 9.7 min) and **4** (21.7 mg, *t_R* 17.7 min). Fraction 6-5 (267.7 mg) was separated by preparative HPLC using a linear gradient of MeCN:H₂O (20:80 → 90:10) over 25 min to yield **2** (2.2 mg, *t_R* 13.4 min), **4** (15.4 mg, *t_R* 14.3 min), **5** (26.1 mg, *t_R* 17.9 min), **3** (2.3 mg, *t_R* 18.3 min), **1** (7.2 mg, *t_R* 20.3 min), and **6** (1.8 mg, *t_R* 21.7 min).

4.3.1. 4-((Z)-but-2-enoyloxy)-12, 13-epoxytrichotheca-7, 9-diene (**1**)

Pale yellow film; [α]_D²⁵ – 25.7 (c 0.38, MeOH); IR (film, acetone) *ν*_{max} 2972, 1713, 1646, 1178, 1085, 961 cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 339.1560 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₉H₂₄O₄Na, 339.1567).

4.3.2. 4-((Z)-but-2-enoyloxy)-12, 13-epoxy-16-hydroxytrichothec-9-ene (**2**)

Pale yellow film; [α]_D²⁸ – 13.5 (c 0.1, MeOH); IR (film, acetone) *ν*_{max} 3413, 2930, 1714, 1647, 1183, 1078, 962 cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 357.1677 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₉H₂₆O₅Na, 357.1672).

4.3.3. 4-((Z)-but-2-enoyloxy)-8-chloro-12-hydroxy-7, 13-epoxytrichothec-9-ene (**3**)

Colorless film; [α]_D²⁵ – 27.5 (c 0.09, MeOH); IR (film, acetone) *ν*_{max} 3416, 2924, 1715, 1180, 1132, 1097, 1046 cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 391.1309 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₉H₂₅³⁵ClO₅Na, 391.1283), 393.1310 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₉H₂₅³⁷ClO₅Na, 393.1261).

4.3.4. 4-((Z)-but-2-enoyloxy)-8, 12-dihydroxy-7, 13-epoxytrichothec-9-ene (**7**)

Colorless film; [α]_D²⁷ – 10.2 (c 0.5, MeOH), {lit. [α]_D²⁵ – 11.0 (c 0.1, CHCl₃) (Sy-Cordero et al., 2011)}; ¹H and ¹³C NMR data matched the literature (Sy-Cordero et al., 2011); HRMS (ESI-TOF) *m/z* 357.1677 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₀H₁₆O₅Na, 357.1672).

Table 1

NMR spectroscopic data of **1**, **2** [¹H (500 MHz) and ¹³C (125 MHz)], and **3** [¹H (400 MHz) and ¹³C (100 MHz)] in acetone-*d*₆.

position	1		2		3	
	δ _H , mult. (J in Hz)	δ _C	δ _H , mult. (J in Hz)	δ _C	δ _H , mult. (J in Hz)	δ _C
2	3.58, d (5.3)	77.6	3.69, d (5.3)	78.8	4.09, d (4.8)	82.5
3	α 2.54, dd (15.2, 7.9) β 1.93, ddd (15.2, 5.3, 3.8)	36.7	α 2.51, dd (15.2, 7.9) β 1.92, ddd (15.2, 5.3, 3.7)	36.4	α 2.27, dd (14.6, 7.9) β 2.21, ddd (14.6, 4.8, 4.8)	37.0
4	5.60, dd (7.9, 3.8)	74.1	5.66, dd (7.9, 3.7)	74.5	5.58, dd (7.9, 4.8)	74.3
5		47.5		48.9		49.8
6		44.2		40.8		39.2
7	5.97, dd (9.8, 1.4)	133.0	α 1.49, m β 1.90, m	23.9	4.11, br s	77.2
8	5.81, dd (9.8, 1.5)	125.4	2.10–2.00, m	23.1	4.28, br s	59.7
9		134.1		142.6		133.1
10	5.51, m	117.9	5.60, m	118.2	5.68, br d (5.8)	124.4
11	3.80, dd (6.1, 1.7)	69.9	3.70, m	69.9	3.77, br d (5.8)	69.2
12		66.3		65.1		73.6
13	α 2.81, d (4.1) β 2.91, d (4.1)	45.9	α 3.02, d (4.1) β 2.82, d (4.1)	47.0	α 3.81, d (11.5) β 3.68, d (11.5)	67.0
14	0.83, s	5.4	0.70, s	5.4	1.08, s	6.1
15	0.97, s	16.0	0.95, s	15.3	1.03, s	16.0
16	1.77, d (1.4)	20.3	3.95, br m	65.0	1.86, s	20.4
1'		165.6		165.6		166.0
2'	5.79, dq (11.5, 1.8)	120.4	5.78, dq (11.5, 1.8)	120.5	5.80, dq (11.5, 1.8)	120.8
3'	6.42, dq (11.5, 7.3)	145.1	6.41, dq (11.5, 7.3)	145.0	6.40, dq (11.5, 7.3)	145.1
4'	2.13, dd (7.3, 1.8)	14.6	2.12, dd (7.3, 1.8)	14.6	2.13, dd (7.3, 1.7)	14.8
12-OH					3.86, s	
16-OH			3.85, br m			

Table 2
Biological activities of compounds **1**, **4**, **5**, and **7**.

Compound	<i>P. falciparum</i> (IC ₅₀ , µg/mL)	Vero cell lines (IC ₅₀ , µg/mL)
1	3.28	11.37
4	0.26	0.58
5	0.05	0.13
7	>10	>50
dihydroartemisinin ^a	0.0004	–
ellipticine ^b	–	1.50–1.60

^a Standard antimalarial drug against *P. falciparum*.

^b Standard compound for cytotoxicity assay against African green monkey kidney fibroblast (Vero) cells.

4.4. Biological assays

Antimalarial activity was performed using the microculture radioisotope technique (Desjardins et al., 1979). *Plasmodium falciparum* (K1, multidrug resistant strain) was maintained in continuous culture (Trager and Jensen, 1976). To 25 µL of a test sample dissolved in 1% DMSO (0.1% final DMSO concentration) was added 200 µL aliquot of ring-stage parasitized erythrocytes (1.5% haematocrit and 1% parasitemia). After 24 h, 0.5 µCi of [³H]-hypoxanthine (Amersham, USA) was added, and then incubated for an additional 24 h. Incorporation of radioactivity, indicating parasite growth, was determined using the TopCount microplate scintillation counter (Packard, USA). The percentage of parasite growth was calculated using the signal counts per minute of the test sample and control conditions. Inhibition concentration (IC₅₀) represents the concentration which causes 50% reduction in parasite growth. Green fluorescent protein-based assay was used to evaluate cytotoxicity against African green monkey kidney fibroblast (Vero) cells (Changsen et al., 2003).

Acknowledgements

This work was supported by National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), and the Thailand Research Fund (Grant No. RSA5780060).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2016.08.017>.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Amagata, T., Rath, C., Rigo, J.F., Tarlov, N., Tenney, K., Valeriote, F.A., Crews, P., 2003. Structures and cytotoxic properties of trichoveroids and their macrolide analogues produced by saltwater culture of *Myrothecium verrucaria*. *J. Med. Chem.* 46, 4342–4350.
- Avent, A.G., Grove, J.F., Hanson, J.R., 1988. ¹³C NMR spectra of some trichothecene mycotoxins and derivatives. *Magn. Reson. Chem.* 26, 475–481.
- Bräse, S., Encinas, A., Keck, J., Nising, C.F., 2009. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chem. Rev.* 109, 3903–3990.
- Changsen, C., Franzblau, S.G., Palittapongarnpim, P., 2003. Improved green fluorescent protein reporter gene-based microplate screening for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3682–3687.
- Chinworrungsee, M., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Chuailua, P., Suksamrarn, A., 2008. Cytotoxic activities of trichothecenes isolated from an endophytic fungus belonging to order Hypocreales. *Arch. Pharm. Res.* 31, 611–616.
- Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D., Chulay, J.D., 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16, 710–718.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.
- Freeman, G.G., Morrison, R.L., 1948. Trichothecin: an antifungal metabolic product of *Trichothecium roseum* Link. *Nature* 162, 30.
- Fruhmann, P., Mikula, H., Wiesenberger, G., Varga, E., Lumpi, D., Stöger, B., Häubl, G., Lemmens, M., Berthiller, F., Krska, R., Adam, G., Hametner, C., Fröhlich, J., 2014. Isolation and structure elucidation of pentahydroxyscirpene, a trichothecene *Fusarium* mycotoxin. *J. Nat. Prod.* 77, 188–192.
- García, C.C., Rosso, M.L., Bertoni, M.D., Maier, M.S., Damonte, E.B., 2002. Evaluation of the antiviral activity against Junin virus of macrocyclic trichothecenes produced by the Hypocrealean epibiont of *Baccharis cordifolia*. *Planta Med.* 68, 209–212.
- Gyimesi, J., Melera, A., 1967. On the structure of crotoxin an antifungal antibiotic. *Tetrahedron Lett.* 17, 1665–1673.
- Hanson, J.R., Marten, T., Sivers, M., 1974. Studies in terpenoid biosynthesis. Part XII. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of the trichothecenes and the biosynthesis of trichothecolone from [2-¹³C] mevalonic acid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1033–1036.
- Iida, A., Konishi, K., Kubo, H., Tomioka, K., Tokuda, H., Nishino, H., 1996. Trichothecins A, B and C, potent anti-tumor promoting sesquiterpenoids from the fungus *Trichothecium roseum*. *Tetrahedron Lett.* 37, 9219–9220.
- Isaka, M., Punya, J., Lertwongrat, Y., Tanticharoen, M., Thebtaranonth, Y., 1999. Antimalarial activity of macrocyclic trichothecenes isolated from the fungus *Myrothecium verrucaria*. *J. Nat. Prod.* 62, 329–331.
- Langley, P., Shuttleworth, A., Sidebottom, P.J., Wrigley, S.K., Fisher, P.J., 1990. A trichothecene from *Spicellium roseum*. *Mycol. Res.* 94, 705–706.
- Loukaci, A., Kayser, O., Bindseil, K.-U., Siems, K., Frevert, J., Abreu, P.M., 2000. New trichothecenes isolated from *Holarrena floribunda*. *J. Nat. Prod.* 63, 52–56.
- McCormick, S.P., Stanley, A.M., Stover, N.A., Alexander, N.J., 2011. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins* 3, 802–814.
- Plattner, R.D., Al-Hetti, M.B., Weisleder, D., Sinclair, J.B., 1988. A new trichothecene from *Trichothecium roseum*. *J. Chem. Res. (M)* 2461–2473.
- Sy-Cordero, A.A., Graf, T.N., Adcock, A.F., Kroll, D.J., Shen, Q., Swanson, S.M., Wani, M. C., Pearce, C.J., Oberlies, N.H., 2011. Cyclodepsipeptides, sesquiterpenoids, and other cytotoxic metabolites from the filamentous fungus *Trichothecium sp.* (MSX 51320). *J. Nat. Prod.* 74, 2137–2142.
- Tanaka, K., Plattner, R.D., Yamagishi, R., Minamisawa, M., Manabe, M., Kawasaki, S., Gareis, M., Okada, G., 2001. 8-Deoxy-trichothecin production by *Spicellium roseum* isolated from a cultivated mushroom in Japan. *Mycotoxins* 51, 71–77.
- Tani, N., Dohi, Y., Onji, Y., Yonemasu, K., 1995. Antiviral activity of trichothecene mycotoxins (deoxynivalenol, fusarenon-X, and nivalenol) against herpes simplex virus types 1 and 2. *Microbiol. Immunol.* 39, 635–637.
- Trager, W., Jensen, J.B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673–675.
- Waterman, C., Calcut, L., Mutka, T., Kyle, D.E., Pearce, C.J., Baker, B.J., 2014. A potent antimalarial trichothecene from hyphomycete species. *Tetrahedron Lett.* 55, 3989–3991.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.