องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *Ascosphaera apis* ของพรอพอลิสจากรังชันโรง

นางสาวชญานี อ๊อดทรัพย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

CHEMICAL COMPOSITIONS AND ANTIFUNGUS *Ascosphaera apis* OF PROPOLIS FROM NEST OF STINGLESS BEE

Miss Chayanee Ot-sup

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Thesis Title	CHEMICAL COMPOSITIONS AND ANTIFUNGUS *Ascosphaera apis* OF PROPOLIS FROM NEST OF STINGLESS BEE
By	Miss Chayanee Ot-sup
Field of study	Biotechnology
Thesis Advisor	Assistant Professor Sureerat Deowanish, D.Agr.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Dr. Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Assistant Professor Sureerat Deowanish, D.Agr)

.....Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D.)

ชญานี อ๊อดทรัพย์ : องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *Ascosphaera apis* ของพรอพอลิสจากรังชันโรง. (CHEMICAL COMPOSITIONS AND ANTIFUNGUS *Ascosphaera apis* OF PROPOLIS FROM NEST OF STINGLESS BEE) อ. ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. สุรีรัตน์ เดี่ยววาณิชย์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. ดร. วรินทร ชวศิริ, 86 หน้า.

พรอพอลิสจากรังชันโรง *Trigona laeviceps* ที่เก็บจากร้อยเอ็ด ประเทศไทย ได้ถูกนำมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Ascophaera apis* ที่ก่อโรคชอล์กบรูด พบว่า ที่ความเข้มข้น 190 ppm ของสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 250 ppm ของสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ได้แยกสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนด้วยคอลัมน์โครมาโทรกราฟีได้ 7 ส่วนย่อย สารสกัดที่แยกได้ในส่วนที่ 3 และ 4 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Ascosphaera apis* ได้โดยใช้วิธี TLC autographic เมื่อนำพรอพอลิสมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วย gas chromatography-mass spectrometer พบว่าสารที่น่าจะเป็นองค์ประกอบคือ 2-methylpropyl ester, camphor, 2, 4 – bis (dimethylbenzyl) - 6 - *t*- butylphenol, 1H- cycloprop[e]azulen-7-ol, 6-oxohuperzine A และ 2,6-diphenyl-1,7-dihydrodipyrrolo[2,3-b:3',2'-E]pyridine สารที่ออกมาที่ Rt 13.02 นาที เป็นองค์ประกอบหลักในพรอพอลิส แต่ไม่มีข้อมูลตรงกับฐานข้อมูลของ Wiley ถึงแม้ว่า camphor ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของส่วนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา แสดงให้เห็นว่า camphor ไม่สามารถยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Ascosphaera apis*

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต ชญานี อ๊อดทรัพย์

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม W. Chawanthi

#4672239223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: ANTIFUNGAL ACTIVITY / PROPOLIS / BIOAUTOGRAPHIC
CHAYANEE OT-SUP : CHEMICAL COMPOSITIONS AND ANTIFUNGUS *Ascosphaera apis* OF PROPOLIS FROM NEST OF STINGLESS BEE. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. SUREERAT DEOWANISH, D. Agr. THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. WARINTHORN CHAVASIRI Ph.D. 86 pp.

Propolis of stingless bee was collected from the nest of *Trigona laeviceps* in Roi Et, Thailand. The dichloromethane crude extract was tested for antifungal activity of the chalkbrood disease, *Ascosphaera apis*. At the concentration of 190 ppm of crude, 50% growth inhibition was observed and 100% growth inhibition could be found at the concentration of 250 ppm. The dichloromethane was further separated into 7 fractions by column chromatography. Fractions 3 and 4 showed the growth inhibition against *Ascosphaera apis* by TLC autographic technique. The chemical compositions of propolis sample were analyzed by gas chromatography-mass spectrometer. GC-MS suggested the possible components including 2-methylpropyl ester, camphor, 2, 4 – bis (dimethylbenzyl) - 6 - *t*- butylphenol, 1H- cycloprop[e]azulen-7-ol, 6- oxohuperzine A and 2,6-diphenyl-1,7-dihydrodipyrrolo[2,3-b:3',2'-E]pyridine. The compound at Rt 13.02 minute was a major constituent in the propolis, but it did not match with the data available in Wiley database. Although camphor was the major constituent in fraction 3, the antifungal activity of camphor did relatively not inhibit the growth of *Ascosphaera apis*.

Field of study Biotechnology Student's singnature .....
Academic year 2006 Advisor's singnature .....
Co-Advisor's singnature .....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my appreciation to my advisor, Assistant Professor Dr. Sureerat Deowanish, and my co-advisor, Assistant Professor Dr. Warinthorn Chavasiri for their assistance and valuable advice in conducting this research.

I would also like to extend my gratitude to Associate Professor Dr. Sirirat Rengpipat and Associate Professor Dr. Nattaya Ngamrojanavanich for their kindness and helpful suggesting for the complements of this thesis and serving as thesis committee.

I also wish to express my sincere appreciation to the Program in Biotechnology, Faculty of Science, and Center of Excellence in Entomology: Bee Biology, Biodiversity of Insects and Mites, Department of Biology and Natural Products Research Unit, Department of Chemistry, Chulalongkorn University for providing facilities throughout the course of my research.

Finally, my deepest gratitude is to my family members for their support and encouragement throughout my study.

CONTENTS

Pages

Abstract in Thai iv
Abstract in English v
Acknowledgements vi
Contents vii
List of Table ix
List of Figure x
List of Schemes xii
List of Abbreviations..... xiii

CHAPTER

I. INTRODUCTION 1

1.1 Propolis..... 1

1.2 Stingless bee..... 8

1.2.1 *Trigona (Tetragonula) laeviceps* Smith, 1857..... 9

1.2.2 Nest architecture and colony characteristics of *Trigona laeviceps*..... 11

1.3 Chalkbrood disease..... 13

II. MATERIALS AND METHODS 18

2.1 Propolis sample..... 18
2.2 Chemicals..... 18
2.3 Equipments..... 18
2.4 Extraction of propolis for preliminary screening test and separation..... 19
2.5 General methods for bioassays..... 21
2.5.1 Fungal cultures..... 21
2.5.2 Conidia suspension preparation..... 22
2.6 Bioassays for antifungal activity..... 22
2.6.1 Effect of dichloromethane crude extract on antifungal (mycelial) activity..... 22

Pages

2.6.2 Effect of dichloromethane crude extract on antifungal (spore) activity..... 23
2.6.3 Bioautographic assay..... 24
2.7 Statistical analysis of data..... 24
III. RESULTS AND DISCUSSION..... 26
3.1 Effect of dichloromethane crude extract on antifungal activity..... 26
3.1.1 Mycelial growth inhibition..... 26
3.1.2 Inhibition of *Ascosphaera apis* spore germination 28
3.2 The fractionation of dichloromethane crude extract..... 30
3.2.1 TLC bioautographic assay of fractionation of dichloromethane crude extract..... 31
3.3 Structural of isolated compounds..... 39
IV. CONCLUSION..... 42
REFERENCES 45
APPENDICES 53
APPENDIX A 54
APPENDIX B 55
APPENDIX C 64
VITA 86

LIST OF TABLES

Table		Page
1.1	Propolis types according to their plant origin and their chemical compositions.....	7
3.1	The mycelial growth inhibition of dichloromethane crude extract.....	26
3.2	Inhibitory effects of dichloromethane crude extract against the spore germination of *Ascosphaera apis* at different times.....	29
3.3	The fractionation of dichloromethane crude extract by quick column chromatograph.....	30
3.4	The spores germinate inhibition of the seven fractions of dichloromethane crude extract.....	33

LIST OF FIGURE

Figure		Page
1.1	The variety of propolis colour.....	1
1.2	Honeybee hive with a lateral slit, which enhances propolis production. Propolis was removed from the left side and bees are working to seal the resultant opening with new propolis deposits...	4
1.3	Distribution of *Trigona laeviceps* in Thailand.....	10
1.4	*Trigona laeviceps* and its nest entrance tube	11
1.5	Nest architecture of : *Trigona laeviceps* in the hive	12
1.6	Honeybee larvae which were infected by chalkbrood disease.(a: Strentched larvae are killed by the disease, b: The cadaver reminiscent of a small piece of chalk.)	14
1.7	The ascomycota life cycle.....	15
2.1	Propolis from the nest of *Trigona laeviceps*.....	20
2.2	The colony characteristics of the *Ascosphaera apis* on PDA used in this research.....	21
2.3	The spores of *Ascosphaera. apis* were determined with an improved Neubreumer haemocytometer under phase contrast microscope (400X)	22
3.1	The mycelial inhibit of crude dichloromethane extract to *Ascosphaera apis* fungi at several concentration.	27
3.2	Linear regression representing the probit of percent inhibition in relation to the logarithm of concentrations (ppm).	27
3.3	The spore germinate inhibition of crude dichloromethane extract to *Ascosphaera apis* (Suspensions of *Ascosphaera apis* conidia dissolved in sterile distilled water, a: 1 hr and d: 24 hr, conidia dissolved in DMSO, b: 1 hr and e: 24 hr, conidia dissolved in 1,000 ppm dichloromethane crude extract, c: 1 hr and f: 24 hr).....	29

Figure		Pages
3.4	Colourations of seven fractions of dichloromethane crude extract...	31
3.5	TLC bioautographic pattern of the fractions of dichloromethane crude extract, sprayed with *Ascosphaera apis* compared with control (DMSO) treatment.	32
3.6	Linear regression representing the Probit of percent inhibition in relation to the logarithm of concentrations of fraction 2 (ppm).....	34
3.7	Linear regression representing the Probit of percent inhibition in relation to the logarithm of concentrations of fraction 3 (ppm)...	35
3.8	Linear regression representing the Probit of percent inhibition in relation to the logarithm of concentrations of fraction 4 (ppm).....	36
3.9	Linear regression representing the Probit of percent inhibition in relation to the logarithm of concentrations of fraction 5 (ppm).....	37
3.10	Linear regression representing the Probit of percent inhibition in relation to the logarithm of concentrations of fraction 6 (ppm).....	38
3.11	Linear regression representing the Probit of percent inhibition in relation to the logarithm of concentrations of fraction 7 (ppm)...	39
3.12	Structures of compounds isolated from propolis of the nest of *Trigona laeviceps*.....	40
4.1	Structures of compounds analyzed from the propolis of the nest of *Trigona laeviceps*.....	43

LIST OF SCHEME

Scheme		Page
2.1	Extraction for preliminary screening test and separation……..	20

LIST OF ABBREVIATIONS

°C	degree celsius
CH_2Cl_2	dichloromethane
cm	centimeter
DMSO	dimethylsulfoxide
EtOAc	ethyl acetate
g	gram
GCMS	gas chromatography mass spectrometer
MeOH	methanol
mg	milligram
ml	milliliter
No.	number
PDA	potato dextrose agar
PDB	potato dextrose broth
ppm	part per million
sp.	species
TLC	Thin-Layer Chromatography
w/w	weight by weight
µl	microliter
UV	ultraviolet