

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อร้า *Ascospshaera apis*  
ของพรอพอลิสจากรังชันโรง

นางสาวชญาณี อ้อมทรัพย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2549  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**CHEMICAL COMPOSITIONS AND ANTIFUNGUS *Ascospaera 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**

**Copyright of Chulalongkorn University**

**492165**

Thesis Title                    CHEMICAL COMPOSITIONS AND ANTIFUNGUS  
*Ascospaera 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

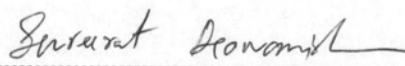
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE



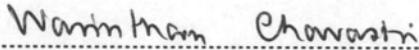
..... Chairman

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



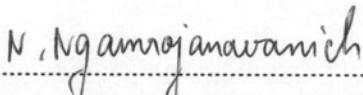
..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Sureerat Deowanish, D.Agr)



..... Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)



..... Member

(Associate Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D.)

ชฎานี อ้อดทรัพย์ : องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *Ascospaera apis* ของพรอพอลิสจากรังชันโรง. (CHEMICAL COMPOSITIONS AND ANTIFUNGUS *Ascospaera apis* OF PROPOLIS FROM NEST OF STINGLESS BEE) อ. ที่ปรึกษา: พศ. ดร. ศุรีรัตน์ เดี่ยววานิชย์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: พศ. ดร. วรินทร ชวศิริ, 86 หน้า.

พรอพอลิสจากรังชันโรง *Trigona laeviceps* ที่เก็บจากร้อยเอ็ด ประเทศไทย ได้ถูกนำมาสกัดด้วยไนโตรมีเทน และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Ascospaera apis* ที่ก่อโรคหลักบนรัง พบว่า ที่ความเข้มข้น 190 ppm ของสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 250 ppm ของสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ได้แยกสิ่งสกัดไนโตรมีเทนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ 7 ส่วนของสารสกัดที่แยกได้ในส่วนที่ 3 และ 4 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Ascospaera apis* ได้โดยใช้วิธี TLC autographic เมื่อนำพรอพอลิสมาวิเคราะห์ทางค์ประกอบด้วย 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 สารที่ออกมาระหว่าง Rt 13.02 นาที เป็นองค์ประกอบหลักในพรอพอลิส แต่ไม่มีข้อมูลตรงกับฐานข้อมูลของ Wiley ถึงแม้ว่า camphor ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของส่วนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา แสดงให้เห็นว่า camphor ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Ascospaera apis*

สาขาวิชา ..... เทคโนโลยีชีวภาพ ..... ลายมือชื่อนิสิต ..... อนุภาณ พงษ์กิจพงษ์ .....  
ปีการศึกษา ..... 2549 ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... พญ. นรร .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ..... W. Chawatana

# #4672239223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: ANTIFUNGAL ACTIVITY / PROPOLIS / BIOAUTOGRAPHIC

CHAYANEE OT-SUP : CHEMICAL COMPOSITIONS AND ANTIFUNGUS

*Ascospaera 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, *Ascospaera 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 *Ascospaera 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 *Ascospaera apis*.

Field of study	Biotechnology	Student's singnature	<i>Seyn ๘๙๙๖</i>
Academic year	2006	Advisor's singnature	<i>Sureerat Deowanish</i>
		Co-Advisor's singnature	<i>W. Chavasiri</i>

## 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 <i>Trigona (Tetragonula) laeviceps</i> Smith, 1857.....	9
1.2.2 Nest architecture and colony characteristics of <i>Trigona laeviceps</i> .....	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 <i>Ascospshaera apis</i> 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

<b>Table</b>		<b>Page</b>
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 <i>Ascospaera apis</i> 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

<b>Figure</b>		<b>Page</b>
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 <i>Trigona laeviceps</i> in Thailand.....	10
1.4	<i>Trigona laeviceps</i> and its nest entrance tube .....	11
1.5	Nest architecture of : <i>Trigona laeviceps</i> in the hive .....	12
1.6	Honeybee larvae which were infected by chalkbrood disease.(a: Stretched 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 <i>Trigona laeviceps</i> .....	20
2.2	The colony characteristics of the <i>Ascospaera apis</i> on PDA used in this research.....	21
2.3	The spores of <i>Ascospaera. apis</i> were determined with an improved Neubreumer haemocytometer under phase contrast microscope (400X) .....	22
3.1	The mycelial inhibit of crude dichloromethane extract to <i>Ascospaera apis</i> 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 <i>Ascospaera apis</i> (Suspensions of <i>Ascospaera apis</i> 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

<b>Figure</b>	<b>Pages</b>
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 <i>Ascospaera apis</i> 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 <i>Trigona laeviceps</i> .....	40
4.1 Structures of compounds analyzed from the propolis of the nest of <i>Trigona laeviceps</i> .....	43

**LIST OF SCHEME**

<b>Scheme</b>		<b>Page</b>
2.1	Extraction for preliminary screening test and separation.....	20

**LIST OF ABBREVIATIONS**

°C	degree celsius
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	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