

**STUDY OF SECONDARY METABOLITE(S) PRODUCED BY  
*NOMURAEA RILEYI* AN ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS**

The background features a large, semi-transparent watermark of the Mahidol University logo. It is a circular emblem with a gold border. Inside the border, there is a blue circle containing a golden Thai-style stupa or tiered umbrella. The Thai text 'มหาวิทยาลัยมหิดล' (Mahidol University) is written in gold around the inner edge of the circle.

**PANNIPA PROMPIBOON**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2008**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

ศึกษาสารทุติยภูมิที่สร้างจากเชื้อราก่อโรคในแมลง *NOMURAEA RILEYI*  
(STUDY OF SECONDARY METABOLITE(S) PRODUCED BY *NOMURAEA RILEYI* AN ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS)

พรรณีภา พรหมพิบูลย์ 4638490 PYBS/D

ป.ร.ด. (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : จันทรเพ็ญ วิวัฒน์, Ph.D. (จุลชีววิทยา), อมเรศ ภูมิรัตน, Ph.D. (แบคทีเรียวิทยา), สมศักดิ์ รุจิรวิวัฒน์, Ph.D. (เคมีอินทรีย์), ดริออน บุญไชย์, Ph.D. (กีฏวิทยา)

### บทคัดย่อ

จากการศึกษาการสร้างสารพิษของเชื้อราก่อโรคในแมลง *Nomuraea rileyi* ที่เป็นสายพันธุ์ที่พบได้ในประเทศไทยโดยพบว่าสารสกัดจากหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) ที่ตายโดยเชื้อราดังกล่าว มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของแมลง *S. frugiperda* (Sf9) จากนั้นได้ทำการแยกบริสุทธิ์สารออกฤทธิ์โดยอาศัยกระบวนการ activity guided fractionation และพิสูจน์สูตรโครงสร้างโดยอาศัยเทคนิคของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์, อินฟราเรดสเปกโตรเมตรี และแมสสเปกโตรสโคปี พบว่าเป็นสาร ergosterol peroxide (5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -epidioxy-24(R)-methylcholesta-6, 22-dien-3 $\beta$ -ol) จากการทดสอบกับเซลล์มะเร็งพบการออกฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ขึ้นกับฮอร์โมน, เซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ไม่ขึ้นกับฮอร์โมน, เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก, เซลล์มะเร็งปากมดลูก, เซลล์มะเร็งปอดและเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในตับที่ค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 5.8, 28.0, 46.7, 58.4, 65.4 และ 105.1  $\mu$ M ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบผลกระทบต่อ การต้านเชื้อเอชไอวีโดยอาศัยวิธี syncytium reduction assay ตรวจสอบ พบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีที่ค่า EC<sub>50</sub> เท่ากับ 15.96  $\mu$ g/ml โดยมีผลกระทบต่อชนิดของเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบต่ำที่ค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 150.77  $\mu$ g/ml จากการทดสอบดังกล่าวมีค่า therapeutic index เท่ากับ 9.45

ผลทดสอบการออกฤทธิ์ของ ergosterol peroxide ต่อหนอนแมลง พบว่ามีฤทธิ์ในการฆ่าหนอนปานกลางคือสามารถฆ่าหนอนกระทู้ผักได้ 46.7 % โดยวิธีทาบนตัวหนอนแต่ไม่ออกฤทธิ์เมื่อทดสอบให้หนอนกิน และไม่สามารถทำให้หนอนตายได้เมื่อนิดเข้าลำตัวของหนอนชนิด *Heliothis virescens* นอกจากนี้ได้ทำการหาปริมาณของ ergosterol peroxide ต่อน้ำหนักแห้ง พบ 0.40  $\mu$ g และ 5.94  $\mu$ g ในหนอนที่ตายด้วยเชื้อราในระยะแรกและระยะหลัง อีกทั้งสามารถพบสารดังกล่าวได้ในเส้นใยและ hyphae body ของเชื้อรา *N. rileyi* อีกโดยมีน้ำหนัก 3.93 และ 5.14  $\mu$ g ต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่างเชื้อราหนึ่งกรัม

134 หน้า

STUDY OF SECONDARY METABOLITE(S) PRODUCED BY *NOMURAEA RILEYI* AN ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS

PANNIPA PROMPIBOON 4638490 PYBS/D

Ph.D. (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)

THESIS ADVISORS : CHANPEN WIWAT, Ph.D. (MICROBIOLOGY),  
AMARET BHUMIRATANA, Ph.D. (BACTERIOLOGY), SOMSAK  
RUCHIRAWAT, Ph.D. (ORGANIC CHEMISTRY), DRION G. BOUCIAS,  
Ph.D.(ENTOMOLOGY)

**ABSTRACT**

This study searches for potential cytotoxic substances produced by *Nomuraea rileyi*, an active compound was isolated from mycosed *Spodoptera litura* through an activity guided fractionation process. The compound, cytotoxic against the Sf9 insect cell line, was identified to be ergosterol peroxide (5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -epidioxy-24(R)-methylcholesta-6, 22-dien-3 $\beta$ -ol) using nuclear magnetic resonance techniques, infrared spectrometry, and mass spectroscopy. Anticancer screens demonstrated that ergosterol peroxide inhibited the growth of hormone-dependent breast cancer cell line (T47D), hormone-independent breast cancer cell line (MDA-MB-231), human epidermoid carcinoma in mouth cell line (KB), human cervical carcinoma cell line (HeLa), lung cancer cell line (H69AR) and human cholangiocarcinoma cell line (HuCCA-1) at IC<sub>50</sub> of 5.8, 28.0, 46.7, 58.4, 65.4 and 105.1  $\mu$ M, respectively. Anti HIV-1 activity of ergosterol peroxide was determined by syncytium reduction assay. The HIV-1 inhibitory activity and cytotoxicity toward host cells were evaluated as EC<sub>50</sub> of 15.96  $\mu$ g/ml and IC<sub>50</sub> of 150.77  $\mu$ g/ml, respectively. The therapeutic index (IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>) of 9.45 was calculated for ergosterol peroxide.

In respect of *in vivo* toxic activity, ergosterol peroxide showed moderate effects against *S. litura* larvae-46.7 % mortality via topical application after 7 day post-treatment whereas the *per os* application had no effect on insect survival. No significant mortality was observed by injecting ergosterol peroxide into *Heliothis virescens*. The amounts of ergosterol peroxide produced by *N. rileyi* cultures under *in vitro* and *in vivo* were quantified. The physiological levels of ergosterol peroxide detected in mycosed and mummified cadavers were at 0.40 and 5.94  $\mu$ g/ g dried weight, respectively. The mycelia and hyphal bodies cultures contained ergosterol peroxide at levels of 3.93 and 5.14  $\mu$ g/g dried weight, respectively. These amounts were less than those needed to cause cytotoxicity response.

KEY WORDS: ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS/ ERGOSTEROL PEROXIDE/  
*NOMURAEA RILEYI*/ *SPODOPTERA LITURA*

134 P.