Agricultural Sci. J. 41 : 1 (Suppl.) : 267-270 (2010) ว. วิทย. กษ. 41 : 1 (พิเศษ) : 267-270 (2553)

กลไกของ metabolites จากเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans* TISTR 3389 ต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum musae* (Berk & Curtis) บนกล้วยหอมทอง

Mechanisms of metabolites from yeast *Aureobasidium pullulans* TISTR 3389 for controlling anthracnose disease of banana cv. Hom Thong, caused by *Colletotrichum musae* (Berk & Curtis)

วีระณีย์ ทองศรี[1,2], เนตรนภิส เขียวขำ[1,2] และ สมศิริ แสงโชติ[1,2]

Veeranee Tongsri[1,2], Netnapis Khewkhom[1,2] and Somsiri Sangchote[1,2]

Abstract

The growth curve of yeast *Aureobasidium pullulans* TISTR 3389 in yeast extract malt extract broth was studied for metabolite production. Stationary growth phase of the yeast was revealed after 3 days of incubation period, whereas cell viability was achieved the highest population at the incubation period of 9 days. Yeast metabolites from 5 day-old-culture was used for controlling anthracnose disease on banana fruits, *Colletotrichum musae* mycelial growth and spore germination. The results showed that metabolites from yeast *A. pullulans* gave a good reduction of disease severity by 81.2%, whereas boiled metabolites at 90°C for 20 min from this yeast decreased disease severity by 33.1%. This metabolites also inhibit the mycelial growth and spore germination of pathogen at the EC_{50} value of 190.4 and 149.0 mg/L, respectively. Inhibition zones of yeast metabolites to two fungi, *Cladosporium cladosporioides* and *C. musae* on TLC plates were shown at the R_f value of 0.68.

Key word: culture filtrate, growth curve, inhibition zone, TLC

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans* TISTR 3389 ใน yeast extract malt extract broth พบว่า stationary phase ของเชื้ออยู่ในช่วงตั้งแต่ 3 วันเป็นต้นไป ซึ่งจำนวนเซลล์ของเชื้อยีสต์มีปริมาณสูงสุดใน 9 วัน และเมื่อนำ metabolites ของเชื้อยีสต์ที่อายุ 5 วันมาทดสอบเพื่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลกล้วยหอมทอง พบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้ 81.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ metabolites ที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิที่ 90°ซ เป็นเวลา 20 นาทีมีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรค 33.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น metabolites ดังกล่าวยังสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum musae* โดยมีค่า EC_{50} ที่ 190.4 และ 149.0 mg/L ตามลำดับ ซึ่งสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา 2 ชนิดบนแผ่น TLC คือ *C. cladosporioides* และ *C. musae* มีค่า R_f อยู่ในช่วง 0.68

คำสำคัญ culture filtrate, growth curve, inhibition zone, TLC

คำนำ

การจัดการโรคแอนแทรคโนสของกล้วยหอมทอง แต่เดิมนิยมใช้วิธีกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี แต่มักพบปัญหาสารตกค้างในผลิตผล ปัจจุบันการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีกลับมีบทบาทสำคัญมากขึ้น โดยเฉพาะการใช้เชื้อยีสต์ในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว ดังเช่นที่พบในเชื้อยีสต์ *A. pullulans* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคผลเน่าของแอปเปิลและสตรอเบอร์รี่ (Ippolito et al., 2000) รวมถึงใช้ในการชักนำเพื่อให้เกิดการสะสมของ defensive enzymes ต่างๆ ในเนื้อเยื่อพืชเพื่อต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืช (Ippolito et al., 2000) แต่ยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและสามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้กลับทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนในผลิตผลเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาผลของ metabolites ที่ได้จากเชื้อยีสต์ *A. pullulans* TISTR 3389 ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. musae* และ *Cladosporium cladosporioides* รวมถึงความรุนแรงของการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลกล้วยหอมทอง ตลอดจนวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ใน metabolites โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเป็นทางเลือกอีกแนวทางหนึ่งในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลิตผลอื่นๆ ตลอดจนเป็นการลดปริมาณการใช้สารเคมีให้น้อยลง

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900
[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900
[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140
[2] Postharvest Technology Innovation Center, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans* ในอาหารเหลวเพื่อการสังเคราะห์ metabolites

นำเชื้อยีสต์ *A. pullulans* TISTR 3389 มา streak บนจานอาหาร yeast extract malt extract agar (YMA) บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (28-30°ซ) ย้ายเซลล์ของเชื้อยีสต์ลงในอาหารเหลว YMB ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 มล. บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ pipette ดูด yeast cell suspension ปริมาตร 1 มล. ลงในอาหารเหลว YMB ปริมาตร 300 มล. ซึ่งบรรจุใน flask ขนาด 500 มล. บ่มเชื้อในสภาพเดิม แบ่ง suspension ออกมาในปริมาตร 5 มล. ทุก ๆ 3 ชั่วโมงเพื่อวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 nm และนับจำนวน colony forming unit (cfu) ที่ 48 ชั่วโมง บนอาหาร YMA

การทดสอบ metabolites จากเชื้อยีสต์ต่อการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลกล้วยหอมทอง

นำเชื้อยีสต์ *A. pullulans* มาเลี้ยงในอาหาร YMB บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 5 วัน กรองเอาเฉพาะ metabolites แล้วแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90°ซ เป็นเวลา 20 นาที อีกส่วนหนึ่งเป็น metabolites ที่ไม่ผ่านความร้อน นำ metabolites มาพ่นลงบนผลกล้วยซึ่งตัดแยกเป็นผลเดี่ยวและผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 5% sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำ และผึ่งให้แห้ง จากนั้นบ่มผลกล้วยในถุงพลาสติกที่มีความชื้นสูงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25°ซ พ่น spore suspension ของเชื้อรา *C. musae* ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนผลกล้วย โดยใช้ airbrush ซึ่งปรับความเข้มข้นของ inoculum ให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อ มล. บ่มผลกล้วยต่ออีก 24 ชั่วโมง จึงเปิดถุงออกและประเมินความรุนแรงของโรค (disease severity) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (no metabolites) การใช้ metabolites ปกติ และการใช้สารละลาย salicylic acid

การทดสอบ metabolites จากเชื้อยีสต์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum musae*

การทดสอบ metabolites ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย : นำ metabolite จากเชื้อยีสต์มาเจือจางด้วยอาหารเหลว YMB ให้ได้ความเข้มข้น 5 ระดับ ได้แก่ 0 50 100 150 และ 200 mg/L ย้ายเชื้อรา *C. musae* ที่มีอายุ 7 วันบนอาหาร PDA ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. มาวางตรงกลางจานอาหารเปล่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. โดยให้ส่วนที่มีเชื้อราอยู่ด้านบน จากนั้นเท metabolite ปริมาตร 20 มล. ลงไป บ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ จากนั้นกรองเอาเฉพาะเส้นใยไปอบแห้ง ชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

การทดสอบ metabolites ต่อการงอกของสปอร์ : หมุนเหวี่ยง spore suspension ของเชื้อรา *C. musae* เข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อ มล. ในสารละลาย 0.98% sodium chloride ปริมาตร 5 มล. จำนวน 5 หลอด ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ผสม metabolite ที่ความเข้มข้น 5 ระดับข้างต้นลงไปหลอดละ 5 มล. ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4°ซ จากนั้นดูด spore suspension ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงเกลี่ยในจานอาหาร water agar บ่มไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นับจำนวนการงอกของสปอร์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ใน metabolites จากเชื้อยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* และ *Colletotrichum musae* โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

การสกัด metabolites จากเชื้อยีสต์ : เลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YMB บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 5 วัน กรองเอาเฉพาะ culture filtrate มาสกัดด้วย dichloromethane (culture filtrate : dichloromethane อัตราส่วน 2 : 1 v/v) โดยใช้ separating funnel นำสารละลาย dichloromethane ไปลดปริมาตรด้วย evaporator ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย methanol ให้ได้ 5 มล. เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20°ซ

การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี TLC : นำสารสกัดจาก metabolites มา load ลงในแผ่น TLC (Silica gel 60 F_{254}) แล้วนำมา run ใน mobile phase (dichloromethane : methanol อัตราส่วน 49 : 1 v/v) พ่น spore suspension ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* และ *C. musae* ในสารละลายอาหาร 1.7% malt extract broth ลงไปบนแผ่น TLC บ่มเชื้อไว้ในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นสูงเป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงฆ่าเชื้อบนแผ่น TLC ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จากนั้นทำการวัดระยะทางของการเกิด clear zone เปรียบเทียบกับระยะทางการเคลื่อนที่ของ mobile phase เพื่อคำนวณหาค่า Retention time (R_f)

ผล

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans* ในอาหารเหลวเพื่อการสังเคราะห์ metabolites

จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *A. pullulans* ในอาหาร YMB พบว่าระยะการเจริญในช่วง lag phase ถึง exponential phase ใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ดังนั้นช่วงเวลาที่ควรเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อสกัด metabolites ควรจะอยู่ในช่วง stationary phase คือ ตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไป (Figure 1A) อย่างไรก็ตาม ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 nm ในช่วง stationary phase จนถึง dead phase มีค่าค่อนข้างสม่ำเสมอ จึงทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดบนอาหาร YMA ซึ่งพบว่าเชื้อยีสต์มีจำนวนเซลล์ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 9 ซึ่งมีจำนวนเซลล์สูงสุด แล้วจึงค่อยๆ ลดลง (Figure 1B)

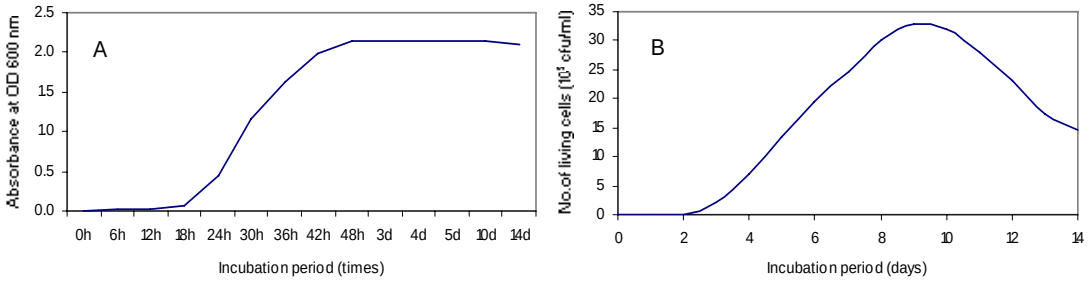

Figure 1 Yeast *Aureobasidium pullulans* TISTR 3389 was grown in yeast extract malt extract broth at room temperature (28-30°C) on shaking at 120 rpm for 14 days. (A) optical density (OD) at 600 nm and (B) cell viability, evaluated by plate counting on yeast extract malt extract agar at 48 h.

การทดสอบ metabolites จากเชื้อยีสต์ต่อการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลกล้วยหอมทอง

จากการนำ metabolites จากเชื้อยีสต์ *A. pullulans* มาต้มที่อุณหภูมิ 90°ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำการพ่นบนผลกล้วย เปรียบเทียบความรุนแรงของโรคกับการใช้ metabolites ปกติและสารละลาย salicylic acid พบว่า metabolites ปกติให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีกว่า โดยสามารถลดการเกิดโรคได้ 81.2 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสารละลาย salicylic acid สามารถลดการเกิดโรคได้ 65.7 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม metabolites ที่ผ่านการต้มยังทำให้เกิดโรคได้น้อยกว่าในชุดควบคุม (Table 1)

Table 1 Anthracnose disease development on banana fruits after treatment with metabolites from yeast *Aureobasidium pullulans* TISTR 3389, boiled metabolites and salicylic acid solution prior challenge with *Colletotrichum musae* for 24 h, incubated at room temperature (28-30°C) for 6 days.

Treatments	Disease severity (%)	Reduction of disease development (%)
Aureobasidium pullulans metabolites	12.5 a	81.2
Boiled *A. pullulans* metabolites	44.5 c	33.1
0.5 mM Salicylic acid solution	22.8 b	65.7
Yeast extract malt extract broth (no metabolites)	66.5 d	-

Mean followed by different letters are significant difference (P=0.05), according to Duncan's multiple range test

การทดสอบ metabolites จากเชื้อยีสต์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum musae*

จากการนำ metabolites 5 ระดับความเข้มข้นมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. musae* พบว่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ยับยั้งและความเข้มข้นของ metabolites (Figure 2) และเมื่อคำนวณจากสมการเส้นตรงของความสัมพันธ์ดังกล่าว พบว่า metabolites จาก *A. pullulans* มีระดับค่า EC_{50} ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและการงอกของสปอร์ที่ 190.4 และ 149.0 mg/L ตามลำดับ

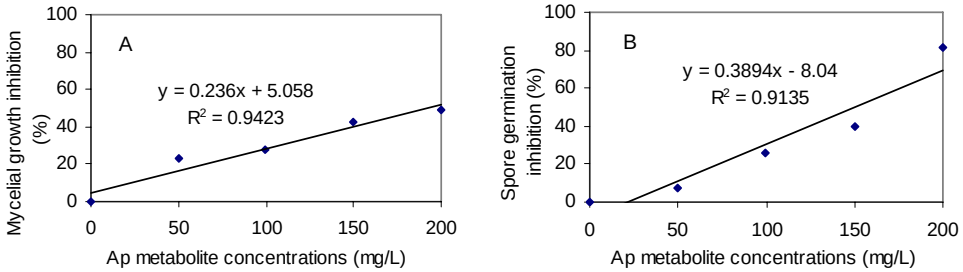

Figure 2 The regression equations of the relationship between various concentrations of metabolites from yeast *Aureobasidium pullulans* TISTR 3389, mycelial growth (A) and spore germination inhibition (B) of *Colletotrichum musae* after incubation for 5 days and 6 h, respectively.

การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ใน metabolites จากเชื้อยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* และ *Colletotrichum musae* โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

จากการ load สารสกัดจาก metabolites ของยีสต์ *A. pullulans* ลงบนแผ่น TLC โดยมีสารละลาย dichloromethane : methanol ในอัตราส่วน 49 : 1 เป็น mobile phase พบว่า metabolites ดังกล่าวมีสารออกฤทธิ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. cladosporioides* และ *C. musae* โดยสารดังกล่าวมีค่า R_f ที่ 0.68

วิจารณ์

เชื้อยีสต์ *A. pullulans* สังเคราะห์ polysaccharide เป็นจำนวนมาก จึงทำให้ suspension มีความข่น (Jelinek et al., 2007) และส่งผลให้ค่าดูดกลืนคลื่นแสงคงที่ *A. pullulans* สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ ß-1,3-glucanase และ chitinase (Chanchaichaovivat et al., 2008) รวมถึงสารปฏิชีวนะ Aureobasidin A (Takesako et al., 1993) ทั้งเอนไซม์และสารเคมีดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. musae* จึงทำให้ความรุนแรงของโรคลดน้อยลง อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ metabolites ที่ผ่านการต้มจะให้ผลในการควบคุมโรคน้อยกว่าใน metabolites ที่ไม่ผ่านความร้อน แต่ก็ยังให้ผลในการควบคุมโรคได้ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าสารประกอบบางอย่างใน metabolites ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคอาจถูกทำลายลงโดยการใช้ความร้อน ส่งผลให้ metabolites มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคบนผลกล้วยลดลง นั่นแสดงว่าสารเหล่านั้นอาจเป็นสารประกอบโปรตีนซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนได้ต่ำนั่นเอง

สรุป

ในระยะ stationary phase ของเชื้อยีสต์ *A. pullulans* ที่เจริญในอาหาร YMB พบว่ามีการสังเคราะห์สารประกอบบางชนิดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. musae* และ *C. cladosporioides* ซึ่งมีผลต่อการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลกล้วยหอมทองได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสารออกฤทธิ์ดังกล่าว มีค่า R_f อยู่ในช่วง 6.8

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Chanchaichaovivat, A., B. Panijpan and P. Ruenwongsa. 2008. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chili anthracnose after harvest. Biological control 47: 207-215.

Ippolito, A., A. El Ghaouth, C.L. Wilson and M. Wisniewski. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense response. Postharvest Biology and Technology 19: 265-272.

Jelinek, M., R. Cristescu, E. Axente, T. Kocourek, J. Dybal, J. Remsa, J. Plestil, D. Mihaiescu, M. Albulescu, T. Buruiana, I. Stamatin, I.N. Mihailescu and D.B. Chrisey. 2007. Matrix assisted pulsed laser evaporation of cinnamate-pullulan and tosylate-pullulan polysaccharide derivative thin films for pharmaceutical applications. Applied Surface Science 253: 7755–7760.

Takesako, K., H. Kuroda, T. Inoue, F. Haruna, Y. Yoshikawa and I. Kato. 1993. Biological properties of Aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic. The Journal of Antibiotics 46: 1414-1420.