

Thesis Title	Biotransformation of Endoperoxide Compound by <i>Aspergillus</i> sp.	
Author	Miss Wannipa Pipatsamut	
Degree	Master of Science (Biotechnology)	
Thesis Advisory Committee	Dr. Angkana Saovapakhiran	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Sirirat Chancharunee	Co-advisor
	Dr. Nisa Chawapun	Co-advisor

ABSTRACT

Artemisinin, sesquiterpene lactone endoperoxide compound, is a promising antimalarial agent for the treatment of multidrug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. In this study, an initial screening of five fungal strains of *Aspergillus* sp., *A. oryzae* (Ozykat-1), *A. niger* TISTR 3254, *A. usamii* TISTR 3258, *A. terricola* TISTR 3109 and *A. melleus* TISTR 3128, was carried out to identify any interesting strains for the transformation of artemisinin. The results from screening test showed that *A. oryzae* (Ozykat-1) and *A. terricola* TISTR 3109 could be used as bioconverters.

The transformed product was isolated from the culture broth and identified as deoxyartemisinin by spectroscopy techniques. The conditions for the transformation of artemisinin to deoxyartemisinin were also investigated. It was found that the single-stage biotransformation of the log phase of *A. oryzae* (Ozykat-1) and *A. terricola* TISTR 3109 containing artemisinin at the final concentration of 0.5 mg/ml in transformed medium II (SDB) at 37°C could transform artemisinin into 12 % and

11% yield of deoxyartemisinin in 6 days. The biological activities of deoxyartemisinin were investigated for antimalarial, antimicrobial and cytotoxic activities. Deoxyartemisinin showed less antimalarial activity with IC_{50} value $1.158 \pm 0.081 \mu\text{M}$ when compared to artemisinin, dihydroartemisinin and mefloquine which IC_{50} values were 0.0110 ± 0.001 , 0.00146 ± 0.006 and $0.0290 \pm 0.002 \mu\text{M}$, respectively. The *in vitro* antimicrobial activities of deoxyartemisinin were evaluated against the selected microbial indicators: *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Escherichia coli* TISTR 780, *Candida albicans* BCC 5390 and *Aspergillus niger* TISTR 3254. It was clear that deoxyartemisinin did not show any antimicrobial activities. The assessment of deoxyartemisinin using MTT assay revealed that deoxyartemisinin could inhibit human colorectal adenocarcinoma HT-29 and human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2 growth with IC_{50} values of 1.649 ± 0.394 and $1.304 \pm 0.210 \text{ mg/ml}$, respectively. Deoxyartemisinin showed significant increase in the inhibition of mouse melanoma B16F10 (ATCC-CRL-6475) growth with IC_{50} value of $0.585 \pm 0.058 \text{ mg/ml}$. This compound also showed the most effective in the inhibition of A549 human lung carcinoma cell line (ATCC-CCL-185) growth with IC_{50} values of $0.394 \pm 0.049 \text{ mg/ml}$ at 95% significance level. However, these IC_{50} values exceed the standard criteria for promising lead compounds verified by the U.S. National Cancer Institute (NCI). The results in this study may provide useful information for the preparation of deoxyartemisinin. Further studies could be conducted to investigate mechanisms and important factors contributing to biotransformation of artemisinin by fungi.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนรูปร่างชีวภาพของสารประกอบเอนโดเพอร์ออกไซด์โดยใช้แอสเพอร์จิลลัส	
ผู้เขียน	นางสาววรรณิภา พิพัฒน์สมุทร	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร. อังคณา เสาวภาคย์หิรัญย์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผศ. ดร. ศิริรัตน์ จันท์จารุณี	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร. นิสา ชาวพันธ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

อาร์ติมิซินินเป็นสารประกอบ sesquiterpene lactone endoperoxide ที่มีฤทธิ์ในการต้านมาลาเรียซึ่งใช้ในการรักษาเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาต้านมาลาเรียอื่นๆ ในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบเชื้อราในกลุ่มแอสเพอร์จิลลัสจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. oryzae* (Ozykat-1), *A. niger* TISTR 3254, *A. usamii* TISTR 3258, *A. terricola* TISTR 3109 และ *A. melleus* TISTR 3128 เพื่อหาสายพันธุ์ที่น่าสนใจในการเปลี่ยนรูปของอาร์ติมิซินิน จากผลการศึกษาพบว่า *A. oryzae* (Ozykat-1) และ *A. terricola* TISTR 3109 สามารถเปลี่ยนรูปของอาร์ติมิซินินได้โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเปลี่ยนรูปร่างชีวภาพนี้ถูกแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อและสามารถระบุได้เป็นคือออกซีอาร์ติมิซินินโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี การศึกษาสภาวะในการเปลี่ยนรูปของอาร์ติมิซินินเป็นคือออกซีอาร์ติมิซินินพบว่ากระบวนการเปลี่ยนรูปแบบ single-stage ในช่วง log phase ของเชื้อรา *A. oryzae* (Ozykat-1) และ *A. terricola* TISTR 3109 ซึ่งมีการเติมอาร์ติมิซินินความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 mg/ml ลงใน transformed medium II (SDB) ที่อุณหภูมิ 37°C สามารถเปลี่ยนรูปของอาร์ติมิซินินเป็นคือออกซีอาร์ติมิซินินได้ถึง 12 และ 11% ภายในระยะเวลา 6 วัน การทดสอบสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของคือออกซีอาร์ติมิซินินเพื่อหาฤทธิ์ในการต้านมาลาเรีย การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง พบว่าคือออกซีอาร์ติมิซินินแสดงฤทธิ์ในการต้านมาลาเรียน้อยกว่าอาร์ติมิซินิน โดยมีค่าการยับยั้งการเจริญของปรสิตที่

50% (IC₅₀) เท่ากับ $1.158 \pm 0.081 \mu\text{M}$ ส่วนอาร์ติมิซินิน, ไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน และเมฟโฟควินมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.110 ± 0.001 , 0.00146 ± 0.006 และ $0.0290 \pm 0.002 \mu\text{M}$ ตามลำดับ เมื่อประเมินคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของไดออกซีอาร์ติมิซินินต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Escherichia coli* TISTR 780, *Candida albicans* BCC 5390 และ *Aspergillus niger* TISTR 3254 ผลการประเมินแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าไดออกซีอาร์ติมิซินินไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ สำหรับการประเมินความเป็นพิษของไดออกซีอาร์ติมิซินินต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงโดยวิธี MTT พบว่าไดออกซีอาร์ติมิซินินแสดงค่าการยับยั้งการเจริญของมะเร็งลำไส้ในมนุษย์ชนิด HT-29 และ Caco-2 ที่ 50% (IC₅₀) เท่ากับ 1.649 ± 0.394 และ 1.304 ± 0.210 มก./มล. ตามลำดับ ไดออกซีอาร์ติมิซินินแสดงการยับยั้งการเจริญต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งผิวหนังในหนู B16F10 (ATCC-CRL-6475) มากกว่าอาร์ติมิซินินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.585 ± 0.058 มก./มล. สารประกอบนี้ยังแสดงประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งปอดในมนุษย์ A549 (ATCC-CCL-185) โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.394 ± 0.049 มก./มล. แต่อย่างไรก็ตามค่า IC₅₀ เหล่านี้เกินเกณฑ์มาตรฐานที่สถาบันมะเร็งแห่งสหรัฐอเมริกากำหนดไว้สำหรับสารนำต้านมะเร็ง ข้อมูลจากการศึกษาในครั้งนี้อาจเป็นประโยชน์ในการเตรียมไดออกซีอาร์ติมิซินิน การศึกษาในลำดับถัดไปควรศึกษาหากลไก และปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของอาร์ติมิซินินโดยใช้ฟังไจ