



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Antimicrobial compounds as side products from the agricultural processing industry

Sumthong, P.

Citation

Sumthong, P. (2007, June 19). *Antimicrobial compounds as side products from the agricultural processing industry*. Division of Pharmacognosy, Section of Metabolomics, Institute of Biology, Faculty of Science, Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12086>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12086>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Micro-organismen resistent tegen de meeste antibiotica komen steeds vaker voor. Als gevolg hiervan is er een grote behoefte aan nieuwe antibiotica. De meeste antibiotica zijn ontwikkeld uit micro-organismen. Planten zijn een interessante bron voor nieuwe antimicrobiële stoffen. Ze zijn goed beschermd tegen micro-organismen, doordat ze antimicrobiële stoffen aanmaken of door de aanmaak van fytoalexinen na een infectie. In dit proefschrift concentreren we ons in het bijzonder op een aantal veel voorkomende plantaardige bronnen met het idee dat planten die al gebruikt worden in agro-industriële processen, een bron van antimicrobiële stoffen kunnen zijn en hiermee in feite een meerwaarde geven aan deze gewassen. Het onderzoek dat in dit proefschrift is gepresenteerd is geconcentreerd op anti-schimmel activiteit van zulke gewassen sinds deze planten bekend staan om hun resistentie zijn tegen de meeste schimmels. Er wordt specifiek gekeken naar anti-houtrot activiteit na een eerste algemene screening op antimicrobiële activiteit.

Hoofdstuk 1 is een algemene introductie die het gebruik van antibiotica in humane medicijnen, voeding, landbouw en huishouden alsmede het gebruik van antibiotica in de veestapel ter discussie stelt. De huidige overconsumptie van antibiotica leidt tot ontstaan van meer resistente micro-organismen. Medicinale planten worden gezien als een bron voor nieuwe antibiotica.

Hoofdstuk 2 is een overzicht van de meest bekende mechanismen achter de antimicrobiële stoffen zoals interacties met onder andere de bacteriële membranen, cel wand synthese, vermenigvuldiging en reparatie van DNA, ribosoombinding en enzymen van het microbiële metabolisme die gebruikt kunnen worden als target in de ontwikkeling van nieuwe medicijnen. De algemene screening methodes zoals de diffusion assay, dilution assay en bioautographic assay en andere meer geavanceerde assays zoals assays met microbiële cellen en assays zich richten op moleculaire targets om op antimicrobiële activiteiten te screenen, worden eveneens beschreven.

In **hoofdstuk 3** worden de antimicrobiële activiteiten beschreven van extracten van *Cannabis sativa* en *Humulus lupulus* bloemen evenals die van zaagsel van tropische hardhoutbomen (*Tectona grandis*, *Xylia xlyocarpa*, *Shorea obtusa*, *Shorea albida* en *Hopea odorata*). Van *C. sativa* en *H. lupulus* is al beschreven dat ze farmacologische en ook antimicrobiële activiteiten bezitten. De reststromen in de industrie na extractie van dit soort planten is een interessante bron om te screenen op antimicrobiële activiteit. Het screenen van

zaagsel van tropisch hardhout is een andere interessante bron om op antimicrobiële activiteit te screenen, omdat hier gemakkelijk winst gemaakt kan worden van een eenvoudig toegankelijke bron. Bovendien is van hardhout bekend dat het resistent is tegen termieten en schimmels. Uit onze screening bleek dat *C. sativa* extract en fracties hiervan de groei van *Bacillus subtilis* en *Escherichia coli* remmen in de zg. paper disc diffusion assay. De sterkste remming werd gevonden bij *B. subtilis*. Deze remming werd gevonden in een fractie uit een chloroform-methanol (CHCl₃-MeOH, 1:1) extract van de *C. sativa* bloem. Deze fractie werd vergeleken met referentie cannabinoïden in de bioautographic assay (biogram assay) en de cannabinoïd zuren tetrahydrocannabinolic acid (THCA), cannabidiolic acid (CBDA) en cannabigerolic acid (CBGA) bleken activiteit te hebben. Het CHCl₃-MeOH (1:1) extract van de bloemen van *H. lupulus* bleek de groei van *Aspergillus niger* in broth dilution te remmen bij een MIC (Minimaal inhiberende concentratie) waarde van 100 ppm. Zaagsel van tropische hardhout bomen, *T. grandis*, *X. xlyocarpa*, *S. obtusa*, *S. albida* en *H. odorata* (CHCl₃-MeOH, 1:1) extracten werden getest op een remmende activiteit voor de groei van *A. niger* in de broth dilution assay. Alleen *T. grandis* bleek een duidelijk remmende werking te hebben op de groei van *A. niger* (MIC = 25 ppm).

Nadat de inhiberende activiteit van *T. grandis* op *A. niger* was aangetoond, werden vervolgens de actieve stoffen uit deze bron geïsoleerd (**Hoofdstuk 4**). De stoffen deoxylapachol, tectoquinone, 2-hydroxymethylanthraquinone, hemitectol (2,2-dimethyl-2*H*-benzo[*h*]chromen-6-ol), tectol en 3'-OH-deoxyisoapachol (2[(1*E*)-3-hydroxy-3-methylbut-1-enyl]naphthoquinone) werden geïsoleerd uit het CHCl₃-MeOH (1:1) extract van zaagsel van *T. grandis*. Deze stoffen werden gescheiden door middel van Centrifugal Partitioning Chromatography (CPC) met een oplosmiddelsysteem bestaande uit *n*-hexane-MeOH-H₂O (50:47.5:2.5). Al deze stoffen, met uitzondering van tectol, vertoonden een anti-schimmel activiteit in de biogram assay.

Om meer te weten te komen over de mogelijk mechanismen van de actieve stoffen werden de extracten van *H. lupulus* en *T. grandis* getest op transgene varianten van *A. niger* (**hoofdstuk 5**). Een aantal transgene varianten vormen een goed model om de schade aan de celwand te meten, doordat ze bij schade, inductie vertonen van het *green fluorescent protein* (GFP) gelabeld 1,3- α -D-glucan synthase. De inductie van het gen met het daaraan gekoppelde GFP gen kan in de schimmelcellen worden gedetecteerd door middel van fluorescentie. De resultaten uit deze test laten zien dat *T. grandis* extract, fractie 87 (hemitectol + tectol) en deoxylapachol, die geïsoleerd zijn uit dit plantenextract, in staat zijn de celwand van de schimmel onder druk te zetten.

Hoofdstuk 6 beschrijft anthranilate synthase (AS) als een interessante target in de zoektocht naar nieuwe antimicrobiële stoffen. AS is een sleutelenzym in de biosyntheseroute van tryptofaan. Dit enzym komt voor in micro-organismen, planten en sommige parasieten, maar niet in zoogdieren. Een HPLC (High Performance Liquid Chromatography) assay werd gebruikt om de mate van inhibitie van plantaardig AS te meten, geproduceerd in een transgene variant van *E. coli*. *Cannabis sativa* bloemen extracten hadden de sterkste inhibitie van AS vergeleken met extracten van twee soorten *H. lupulus* bloemen extracten. Onder de cannabinoïden vertoonde CBGA de sterkste inhibitie, gevolgd door THCA. Ook de hop bitterzuren inhibeerden AS sterk, met name adhumulone vertoonde een sterkste inhibitie, gevolgd door de β -zuren en humulone. Iso-*trans*-adhumulone vertoonde de sterkste inhibitie vergeleken met andere iso- α -zuren en iso-*cis*-adhumulone.

Nadat de actieve stoffen waren geïdentificeerd, werden ze ook getest op hun activiteit tegen houtrot schimmels. In **Hoofdstuk 7** worden de houtrot schimmel remmende werkingen beschreven van extracten van *C. sativa* en *H. lupulus* evenals die van zaagsel van tropische hardhoutbomen (*Tectona grandis*, *Xylia xlyocarpa*, *Shorea obtusa*, *Shorea albida* en *Hopea odorata*) in de paper-disc diffusion assay en de agar plate dilution assays. *Tectona grandis* en *H. lupulus* extracten remde meer houtrot varianten vergeleken met de andere extracten. Deoxylapachol geïsoleerd uit *T. grandis* remde de groei van *brown rot fungi*, *Gloephyllum sepiarium* CBS 353.74 en *Gloephyllum trabeum* CBS 318.50 en de *white rot fungi*, *Phlebia brevispora* CBS 509.52 en *Merulius tremellosus* CBS 280.73. Een mogelijk mechanisme achter de inhiberende activiteit op houtrot door cellulase te gebruiken als een target enzym voor het vinden van schimmel remmende stoffen. Fractie 87 (hemitectol + tectol) van het *T. grandis* extract vertoonde een sterke inhibitie van het cellulase enzym vergeleken met andere uit *T. grandis* en *H. lupulus* geïsoleerde stoffen. Humulone uit *H. lupulus* inhibeerde *brown rot fungi*, *G. sepiarium* 317.50 CBS en CBS 353.74, *G. trabeum* CBS 318 en CBS 335.49 en *S. lacrymans* CBS 520.91 and CBS 751.79, maar vertoonde een laag percentage cellulase inhibitie.

Het ontdekken van nieuwe antimicrobiële stoffen vereist niet alleen goede assays om de activiteit te bepalen tijdens het screenen, maar eveneens de assays om het mechanisme achter de activiteit te bepalen en daarmee de target van de stoffen in kwestie. Daar waar de structuuropheldering van deze stoffen gedaan kan worden met hoeveelheden in de orde van milligrammen, zijn er grotere hoeveelheden nodig voor uitgebreide biologische testen. CPC heeft bewezen een uitstekend middel te zijn voor opschaling van dit soort stoffen. Van de geteste actieve stoffen bleek hemitectol een sterk remmende activiteit te hebben op *A. niger* en cellulase, maar hemitectol is geen stabiele stof. α -zuren en β -zuren remmen anthranilate synthase, maar

zijn eveneens makkelijk afbreekbaar. De bekende stof deoxyapachol heeft sterke antimicrobiële activiteiten zoals het onder druk zetten van de schimmel celwand en van een vergelijkbare stof, lapachol, is beschreven dat het een antitumor werking heeft. De cytotoxiciteit moet nog verder worden onderzocht. De in dit onderzoek gevonden stoffen zouden kunnen dienen als leads voor (semi-)synthese van nieuwe antimicrobiële stoffen. Voor de toepassing in houtrotbescherming of andere toepassingen zoals bijvoorbeeld katoen-coatings of levensmiddelproductie is het interessant om een polymeer van de actieve stoffen te maken of ze chemisch te binden aan bepaalde materialen.

Dit werk is een *proof of concept* voor de hypothese dat eenvoudige ruwe grondstoffen en reststromen uit talrijke industrieën en land- en tuin-bouw kunnen dienen als bronnen voor interessante en belangrijke bio-actieve stoffen. De volgende stap is de ontwikkeling van een gestandaardiseerd protocol voor een screeningsprogramma voor verschillende soorten materiaal. Gezien het feit dat er in een klein aantal gescreende samples hier al een aantal interessante stoffen zijn ontdekt, kan men verwachten dat er uit een goed opgezette screening een aantal interessante *hits* zullen voortkomen.

Hoofdstuk 8 beschrijft de mogelijkheid om te screenen op ruwe grondstoffen en reststromen van de industrie en land- en tuin-bouw om nieuwe producten te ontwikkelen zoals medicijnen, voedsel- en veevoer additieven en gewasbeschermers. Ze kunnen ook worden gebruikt in de ontwikkeling van antibiotica voor vis-, en garnalenkwekerijen, anti-schimmel stoffen voor houtimpregnatie en huishoudelijke producten. De aanpak van zulk soort toepassingen wordt toegelicht in twee schema's, een op laboratoriumschaal en een andere op industriële schaal.