สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแบคทีเรียจากทะเล *Alteromonas* sp. S9730

นาย ชยาลักษณ์ ทองดัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-470-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19403458

BIOACTIVE SUBSTANCES FROM A MARINE BACTERIUM, *Alteromonas* sp. S9730

Mr. Chayaluk Thongton

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Degree of Master of Science Program in Marine Science
Department of Marine Science
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998

ISBN 974-332-470-4

Thesis Title	Bioactive substances from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. S9730
By	Mr. Chayaluk Thongton
Department	Marine Science
Thesis advisor	Associate Professor Somkiat Piyatiratitivorakul, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Mr. Prasat Kittakoop, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Mr. Khanit Suwanborirux, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirement for the Master's Degree

..... Dean of Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis committee

..... Chairman

(Assistant Professor Surapol Sudara, Ph.D.)

..... Thesis advisor

(Associate Professor Somkiat Piyatiratitivorakul, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Mr. Prasat Kittakoop, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Mr. Khanit Suwanborirux, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ชยาลักษณ์ ทองดัน : สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแบคทีเรียจากทะเล Alteromonas sp. S9730 (BIOACTIVE SUBSTANCES FROM A MARINE BACTERIA, Alteromonas sp. S9730) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. ประสาท กิตตะคุปต์, ดร. คณิต สุวรรณวิรักษ์, 88 หน้า. ISBN 974-332-470-4.

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี ของเชื้อแบคทีเรีย S9730 ซึ่งแยกได้จาก hydroid ชนิดหนึ่ง บริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อนี้ได้เป็น Alteromonas species สิ่งสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้ง Escherichia coli ATCC 25922 และ Staphylococcus aureus ATCC 25923 เมื่อนำสิ่งสกัดไปทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธีการทางโครมาโทกราฟฟี ทำให้สามารถแยกสารในกลุ่ม indole alkaloids ได้ 1 ชนิด คือ isatin และสารในกลุ่ม diketopiperazines ได้ 2 ชนิด คือ cyclo (Gly-Pro) และ cyclo (Pro-Leu) ได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางกายภาพ และหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารทั้ง 2 ชนิด โดยการวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมของ UV, IR, MS และ NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลของสารที่ทราบสูตรโครงสร้างทางเคมี เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า สาร isatin มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Escherichia coli ATCC 25922 และ Staphylococcus aureus ATCC 25923 ที่ค่า MIC 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้าน Vibrio species ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งที่ค่า MIC 31.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการศึกษาปริมาณของสาร isatin ในเชื้อแบคทีเรียอายุ 3 วัน พบว่า ในสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน มี isatin เป็นองค์ประกอบถึง 89% ของน้ำหนักสิ่งสกัด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่อนิสิต Chayalak Thongtan

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Somkiat P

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Khanit Suvanbe

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C825895 : MAJOR MARINE SCIENCE
KEY WORD: Alteromonas sp. / MARINE BACTERIA / MARINE NATURAL PRODUCTS / ANTIBACTERIAL ACTIVITY / ISATIN / DIKETOPIPERAZINE

CHAYALUK THONGTON : BIOACTIVE SUBSTANCES FROM A MARINE BACTERIUM, Alteromonas sp. S9730 THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMKIAT PIYATIRATITIVORAKUL, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : PRASAT KITTAKOOP, Ph.D., KHANIT SUWANBORIRUX, Ph.D. 88 pp. ISBN 974-332-470-4.

Based on morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics studies, the bacterium S9730 which was isolated from an unidentified hydroid collected from Si Chang Island, Chonburi province, was identified as a species of the Alteromonas bacteria. The dichloromethane extract from the fermentation broth of the bacterium showed antibacterial activity against both Escherichia coli ATCC 25922 and Staphylococcus aureus ATCC 25923 bacteria. An indole alkaloid (isatin), together with two known diketopiperazines including cyclo (Gly-Pro) and cyclo (Pro-Leu), were obtained from the dichloromethane extract after the purification with chromatographic techniques. The structures of all compounds were determined based on analysis of their spectral data (UV, IR, MS and NMR). Isatin exhibited moderate antibacterial activity against both Escherichia coli ATCC 25922 and Staphylococcus aureus ATCC 25923 at the MIC of 62.5 µg/ml, and against the shrimp pathogens, Vibrio species, at the MIC of 31.3 µg/ml. It was found that the Alteromonas sp. S9730, after 3 days fermentation, could produce isatin up to 89% of the crude dichloromethane extracts.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่อนิสิต Chayaluk Thongton

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Somkiat P.

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Khanit Suwanborirux

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my appreciation and grateful thank my thesis advisor, Associate Professor Dr. Somkiat Piyatiratitivorakul of the Department of Marine Sciences, Faculty of Sciences, Chulalongkorn University, for his guidance and encouragement thoughout my research study.

I would like to express my grateful thank to my thesis co-advisors, Dr. Khanit Suwanborirux of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University and Dr. Prasat Kittakop of National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for their kind assistance, valuable advice.

I wish to express my sincere thanks to Associate Professor Dr. Somboon Tanasupawat of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his valuable advice.

I would like to thank Assistant Professor Dr. Nongluksna Sriubolmas, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her kind suggestion and assistance in determination antimicrobial activity.

I would like to thank to Professor Dr. Piamsak Menasveta, Marine Biotechnology research Unit (MBRU) and the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for the scholarship of this study.

I am very thankful to Department of Pharmacognosy and Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for support of equipment.

I would like to thank to the members of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Department of Marine Sciences, Faculty of Sciences, Chulalongkorn University for their kindness and help.

CONTENTS

page

ABSTRACT (English) iv

ABSTRACT (Thai) v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES x

LIST OF FIGURES xi

LIST OF SCHEMES xiii

ABBREVIATIONS xiv

CHAPTER

I. INTRODUCTION 1

II. REVIEW OF LITERATURE

1. Natural product substances from marine bacteria 7

2. Natural products and characterizations of marine bacteria, *Alteromonas* sp. 20

2.1 Natural products of marine bacteria, *Alteromonas* sp. 20

2.2 characterizations of marine bacteria, *Alteromonas* sp. 23

3. Diketopiperazines from marine organisms 28

III. MATERIALS AND MATHODS

1. Sample collection and isolation 33

2. Identification of bacteria 33

3. Fermentation conditions 33

4. Chromatography techniques 34

4.1 Analytical thin-layer Chromatography 34

4.2 Column Chromatography 34

4.2.1 Gel Filtration Chromatography 34

4.2.2 Flash Column Chromatography 35

4.2.3 High Performance Liquid Chromatography 35
4.3 Crystallization technique 36
5. Spectroscopy 36
5.1 Proton and Carbon Nuclear Magnetic Resonance
(^{1}H and ^{13}C NMR) spectra 36
5.2 Mass Spectra (MS) 36
5.3 Ultraviolet (UV) Absorption Spectra 36
5.4 Infrared (IR) Absorption Spectra 36
5.5 Optical Rotation 37
6. Extraction 37
7. Isolation and purification of the extract 39
8. Antimicrobial test 40
8.1 Disk Diffusion method 40
8.1.1 Preparation of inoculum 40
8.1.2 Sample preparation for antimicrobial test 41
8.1.3 Antimicrobial assay 42
8.2 Determination of Minimum Inhibition Concentration
(MIC) 42
8.2.1 Preparation of the bacteria 42
8.2.2 Antibacterial assay for the determination of MIC 43
8.3 Media
8.3.1 Tryticase soy agar (TSA) 43
8.3.2 Sabouraud dextrose agar (SDA) 44
8.3.3 Mueller Hinton Broth (MHB) 44
8.3.4 Marine Broth (MB) 45
9. Determination of bacterial growth 45
10. Determination of yield ofbioactive compounds 46

IV RESULTS AND DISCUSSIONS

1. Isolation and identification of bacteria 47

2. Structure elucidation of isolated compounds 50

2.1 Compound K005 50

2.2 Compound K002 56

2.3 Compound K004 65

3. Antibacterial activity of compounds K004 and K005 73

4. Production of isatin from *Alteromonas* sp. S9730 76

V CONCLUSION 78

REFERENCES 79

VITA 88

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		page
1	Natural products from marine microorganisms	7
2	Differential characteristics of *Alteromonas* and related genera	24
3	Differential characteristics of the species of the genus *Alteromonas*	25
4	Source of diketopiperazines from marine organisms	28
5	Purification of CH_2Cl_2 extract by a Sephadex LH-20 column	38
6	Purification of F006 by flash column chromatography	39
7	Characteristics of *Alteromonas* sp. S97-30	49
8	^{1}H and ^{13}C NMR spectra of compound K002 (in $CDCl_3$) compare with *cyclo (-Pro-Leu-)*	64
9	^{1}H and ^{13}C NMR spectra of compound K004 (DMSO-d_6) and isatin (in $CDCl_3$)	72
10	Antibacterial activity of K004 and K005 (100 μg/disc)	73
11	Minimum inhibition concentration of compound K004 (isatin)	74
12	The MIC values of chemotherapeutants used for the treatment of vibriosis in shrimp	74

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		page
1	Scanning electron micrograph of S9730	47
2	The colonial appearance of S9730 on marine agar plate at 30°C for 3 days	48
3	EI mass spectrum of compound K005	51
4	IR spectrum of compound K005	51
5	300 MHz ^{1}H NMR spectrum of compound K005 (in $CDCl_3$)	52
6	75 MHz ^{13}C NMR spectrum of compound K005 (in $CDCl_3$)	53
7	DEPT 135 spectrum of compound K005 (in $CDCl_3$)	54
8	COSY 45 spectrum of compound K005 (in $CDCl_3$)	55
9	*Cyclo-(Gly-Pro)*	55
10	EI mass spectrum of compound K002	56
11	IR spectrum of compound K002	57
12	300 MHz ^{1}H NMR spectrum of compound K002 (in $CDCl_3$)	58
13	75 MHz ^{13}C NMR spectrum of compound K002 (in $CDCl_3$)	59
14	DEPT 90 spectrum of compound K002 (in $CDCl_3$)	60
15	DEPT 135 spectrum of compound K002 (in $CDCl_3$)	60
16	COSY 45 spectrum of compound K002 (in $CDCl_3$)	61
17	HMQC spectrum of compound K002 (in $CDCl_3$)	62
18	*Cyclo (-Pro-Leu-)*	63
19	EI mass spectrum of compound K004	65
20	IR spectrum of compound K004	66
21	300 MHz ^{1}H NMR spectrum of compound K004 (in DMSO-d_6).	67
22	75 MHz ^{13}C NMR spectrum of compound K004 (in DMSO-d_6).	68
23	DEPT 135 spectrum of compound K004 (in DMSO-d_6)	69

24	COSY 45 spectrum of compound K004 (in DMSO-d_6)	70
25	HETCOR NMR spectrum of compound K004 (in DMSO-d_6)	71
26	Isatin	72
27	Growth curve of *Alteromonas* sp. S9730 in 7 days	76
28	Weight of isatin in CH_2Cl_2 crude extract	77

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF SCHEMES

Scheme		page
1	Separation of *Alteromonas* sp. S9730	37
2	Isolation and purification of CH_2Cl_2 extract	40

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

$[\alpha]^{20}_{D}$	=	speccific rotation at 20°C and sodium D line (589 nm)
ATCC	=	American Type Culture Collection, Maryland, USA
br s	=	broad singlet
°C	=	degree celsius
^{13}C nmr	=	carbon-13 nuclear magnetic resonance
$CDCl_3$	=	deuterated chloroform
$CHCl_3$	=	chloroform
CH_2Cl_2	=	dichloromathane
CH_3CN	=	acetonitrile
cm	=	centimeter
COSY	=	correlation spectoscopy
δ	=	chemical shift
d	=	doublet
dd	=	doublet of doublet
DMSO-d_6	=	deuterated dimethylsulphoxide
ε	=	molar absorpitivity
g	=	gram
μg	=	microgram
h	=	hour
HETCOR	=	heteronuclear shift correlation spectoscopy
HMQC	=	^{1}H-detected heteronuclear multiple quantum coherence
^{1}H nmr	=	proton nuclear magnetic resonance
Hz	=	hertz
IR	=	infrared
J	=	coupling constant

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

µl	=	microliter
l	=	liter
λ_{max}	=	wavelength at maximal absorption
M^+	=	molecular ion
m	=	multiplet
µm	=	micrometer
MeOH	=	methanol
mg	=	milligram
MHz	=	megahertz
MIC	=	minimum inhibition concentration
min	=	minute
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
MS	=	mass spectrum
nm	=	nanometer
NMR	=	nuclear magnetic resonance
ppm	=	part per million
sp.	=	species
t	=	triplet
THF	=	tetrahydrofuran
TLC	=	thin layer chromatography
UV	=	ultraviolet

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย