# สารปฏิชีวนะต้านแบคทีเรียจาก
# เชื้อ *Micromonospora* species ที่แยกได้จากดิน

นางสาว จิราภรณ์ ชั้นทองคำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชเวท ภาควิชาเภสัชเวท

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-639-540-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 18226 23X

# ANTIBACTERIAL ANTIBIOTICS FROM *MICROMONOSPORA* SPECIES ISOLATED FROM SOIL

Miss Jiraporn Chantongcome

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Pharmacognosy

Graduate School

Chulalongkorn University

Acedemic Year 1998

ISBN 974-639-540-8

| | |
|---|---|
| Thesis Tittle | Antibacterial antibiotics from *Micromonospora* species isolated from soil. |
| By | Miss. Jiraphorn Chantongcome |
| Department | Pharmacognosy |
| Thesis Advisor | Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth |
| Thesis Co-advisor | Associate Professor Dr. Somboon Tanasupawat |

---

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

--------------------------------------------Dean of Graduate School.

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis commitee

--------------------------------------------Chairman

(Associate Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.)

--------------------------------------------Thesis Advisor

(Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, M. Sc. in Pharm)

--------------------------------------------Thesis Co-advisor

(Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.)

--------------------------------------------Member

(Associate Professor Suratana Aumnuoypol, M. Sc. in Pharm.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จิราภรณ์ ชั้นทองคำ : สารปฏิชีวนะต้านแบคทีเรียจากเชื้อ *Micromonospora* species ที่แยกได้จากดิน (Antibacterial antibiotic from *Micromonospora* species isolated from soil) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 87 หน้า. ISBN 974-639-540-8

ได้แยกเชื้อ 33 สายพันธุ์ที่โคโลนีสีคล้ำขึ้นจากดินทะเลและดินบกจำนวน 22 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย ผลการคัดเลือกเชื้อขั้นต้นพบว่าเชื้อส่วนใหญ่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ATCC 25922 จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ พิสูจน์เอกลักษณ์ได้ว่าทุกสายพันธุ์เป็นเชื้อ *Micromonospora* species นำเชื้อสายพันธุ์ JSM 5-1, JSM 1-3 และ A-25 ที่ให้ผลดีต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบ ไปศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลวต่างชนิดและ pH รวมทั้งอุณหภูมิในการเลี้ยงแตกต่างกันพบว่าการเลี้ยงในอาหาร Glucose Soybean ที่ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 28°C จะให้ผลในการสร้างสารปฏิชีวนะได้ดี สิ่งสกัดชั้นเอธิลอะซิเตทจากของเหลวที่หมักด้วยเชื้อมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด เมื่อนำสิ่งสกัดนี้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการโครมาโตกราฟฟีสามารถแยกสารในกลุ่ม isoflavone ได้เป็น genistein การพิสูจน์เอกลักษณ์และหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารทั้งหมดนี้ทำโดยวิเคราะห์ข้อมูลจากสเปคตรัมของ MS และ NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลของสารที่ทราบสูตรโครงสร้างทางเคมีแล้ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ......เภสัชเวท...... ลายมือชื่อนิสิต ......จิราภรณ์ ชั้นทองคำ......

สาขาวิชา ......เภสัชเวท...... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..........

ปีการศึกษา ......2541...... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ..........

## C875534 : MAJOR PHARMACOGNOSY
KEY WORD: ANTIMICROBIAL / ANTIBIOTIC / *MICROMONOSPORA*

JIRAPHORN CHANTONGCOME : ANTIBACTERIAL ANTIBIOTICS FROM MICROMONOSPORA SPECIES ISOLATED FROM SOIL. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. CHAIYO CHAICHANTIPYUTH, M.Sc. in Pharm, . THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMBOON TANASUPAWAT, Ph.D. 87 page, ISBN 974-639-540-8

A total of 33 strains of dark hue, moist colonies were isolated from 22 marine and terrestrial soils samples collected from different provinces in Thailand. The results of primary screening of antimicrobial activities of them indicated that they could inhibit gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and gram-negative bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922. Based on morphological, cultural, physiological, and biochemical characteristics studies, they were identified as *Micromonospora* species. The potent strains, JSM 5-1, JSM 1-3, and A-25 were used for antibiotics production in diverse liquid media at different pHs and temperatures. It was found that those cultivated in Glucose Soybean Medium, pH 7.0 at 28°C, showed high antibacterial activities. The ethyl acetate extract of the fermentation broth showed a wide range of antibacterial activities. Through the use of several chromatographic technique an isoflavanone was separated from this extract and identified as genistein. The structure of this compound was determined by comparison of its MS and NMR properties with previously reported data.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อนิสิต Jiraphorn Chantongcome

สาขาวิชา เภสัชเวท ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Chaiyo Chaichantipyuth

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Somboon Tanasupawat

# ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deepest appreciation and grateful thank to my thesis advisor, Associate Professor Chaiyo Chaichantipayuth of the Department of Pharmacognosy, Facultly of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for his excellent instruction, encouragement and guidance throughout this study.

I would like to express my grateful thank to my co-advisor, 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 to the members of the Department of Pharmacognosy and Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their kindness and helps.

I am very thankful to Department of Pharmacognocy and Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for support of some equipments.

I would like to thank my teachers and my friends at the Department of Pharmacognocy and Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their contribution and friendship.

I would like to thank the Graduate School of Chulalongkorn University for granting partial financial support to conduct this investigation.

Finally, I wish to express my infinite gratitude to my family for their love, understanding and encouragement throughout my life.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# CONTENTS


| | | Page |
|---|---|---|
| ABSTRACT(Thai) | | iv |
| ABSTRACT(English) | | v |
| ACKNOWLEDGEMENTS | | vi |
| CONTENTS | | vii |
| LIST OF TABLES | | ix |
| LIST OF FIGURES | | xi |
| LIST OF SCHEMES | | xii |
| ABBREVIATIONS | | xiii |
| CHAPTER | | |
| I. | INTRODUCTION | 1 |
| II. | REVIEW AND LITERATURE | |
| | 1. Antibiotics from *Micromonospora* species | 3 |
| | 2. Characteristics of genus *Micromonospora* | 8 |
| | 3. Antibiotic screening | 22 |
| | 4. Fermentation of antibiotics | 26 |
| | 5. Isolation and purification of antibiotics | 30 |
| III. | EXPERIMENTAL | |
| | 1. Methods for isolation of *Micromonospora* | 32 |
| | 2. Primary screening of isolates for antibiotic production | 32 |
| | 3. Identification of strains | 33 |
| | 3.1 Morphological and cultural characteristics | 33 |
| | 3.2 Biochemical and Physiological characteristics | 34 |
| | 4. Production of antibiotics in submerged cultures | |
| | 4.1 Cultivation | 38 |
| | 4.2 Antibiotic assay | 38 |
| | 4.3 Fermentation conditions | 39 |

5 General techniques for isolation of pure compounds
5.1 Analytical thin layer chromatography.................................. 40
5.2 Column chromatography.................................................. 40
5.3 Spectroscopy............................................................... 41
5.4 Solvents..................................................................... 42
6. Extraction..................................................................... 42
7. Isolation and purification of the extracts.................................. 43
8. Spectral data of isolated compounds........................................ 43
IV. RESULTS AND DISCUSSION
1. Isolation of strains ............................................................ 47
2. Primary screening of isolates for antibiotic production
*Micromonospora* species.......................................................... 47
3. Identification of strains
3.1 Morphological and cultural characteristics........................... 47
3.2 Biochemical and Physiological characteristics...................... 48
4. Production of antibiotics in submerged cultures
4.1 Antibiotic production of 3 strains in various media ........... 51
4.2 Effect of pH and temperature on antibiotic production....... 51
5. Antibacterial activity of Extracts and Structure
determination of compound JM-1.......................................... 51
V. CONCLUSION.................................................................... 75
REFERENCES........................................................................ 76
APPENDIX............................................................................ 80
VITA..................................................................................... 87

# LIST OF TABLES


| Table | | Page |
|---|---|---|
| 1. | Antibiotics from the genus *Micromonospora* | 4 |
| 2. | Antimicrobial activity and enzyme inhibitor of antibiotics from *Micromonospora* species | 9 |
| 3. | Differential characteristics of the genus *Micromonospora* | 24 |
| 4 | Nutrients and condition for antibiotic production of the genus *Micromonospora* | 27 |
| 5. | Sources of soil samples and isolates | 52 |
| 6. | Antibacterial activities of *Micromonospora* isolates | 53 |
| 7. | Morphological and cultural characteristics of *Micromonosporapora* species on YMA | 55 |
| 8. | Cultural characteristics of *Micromonospora* strains on different media for 10 days | 57 |
| 9. | Utilization of various carbon sources by *Micromonospora* isolates | 58 |
| 10. | Biochemical and physiological characteristics of *Micromonospora* species | 60 |
| 11. | Biochemical characteristics of *Micromonospora* sp. JSM5-1, JSM1-3 and A-25 | 62 |
| 12. | Antibacterial activity of the selected isolates in different media | 63 |
| 13. | Effect of pHs on antibacterial activity of *Micromonospora* sp. JSM5-1 | 64 |

14. Effects of temperatures on antibacterial activity of *Micromonospora* sp. JSM5-1 ........ 65

15. Antibacterial activity of extracts from *Micromonospora* sp. JSM5-1, JSM1-3 and A-25 ........ 65

16. Antibacterial activity of ethyl acetate extract from *Micromonospora* spp ........ 66

17. $^{1}$H NMR assignments of compound JM-1 (in DMSO-$d_6$) and genistein * (in DMSO-$d_6$) ........ 69

18. $^{13}$C NMR assignments of compound JM-1 (in DMSO-$d_6$) and genistein * (in DMSO-$d_6$) ........ 70


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# LIST OF FIGURES


| Figure | | Page |
|---|---|---|
| 1 | Scanning electron micrograph of spore-bearing substrate mycelium of *Micromonospora* sp. JSM5-1 on YMA for 10 days | 49 |
| 2. | The colonial appearance of the selected strains JSM5-1 (1), JSM1-3 (2), A-25 (3) and *Micromonospora chalcea* KA 579 (4) | 50 |
| 3. | EI mass spectrum of compound JM-1 | 71 |
| 4. | $^{1}$H NMR spectrum (300 MHz) of compound JM-1(in DMSO-$d_6$) | 72 |
| 5. | $^{13}$C NMR spectrum (75 MHz) of compound JM-1((in DMSO-$d_6$) | 73 |
| 6. | Structure of compound JM-1 | 74 |

# LIST OF SCHEMES

**Scheme** **Page**

1. Fermentation of *Micromonospora* sp. JSM5-1 ........................................ 44

2. Separation of *Micromonospora* sp. JSM5-1 ........................................ 45

3. Isolation and purification of compound JM-1 ........................................ 46

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ABBREVATIONS

| | | |
|---|---|---|
| ATCC | = | American Type Culture Collection, Maryland, USA |
| BuOH | = | Buthanol |
| °C | = | degree celsius |
| cm | = | centrimeter |
| $^{13}$C nmr | = | carbon-13 nuclear magnetic resonance |
| d | = | doublet |
| dd | = | doublet of doublets (for NMR spectra) |
| DMSO | = | dimethysulfoxide |
| DMSO$d_6$ | = | deuterated dimethysulfoxide |
| δ | = | chemical shift |
| EIMS | = | Electron Impact Mass Spectrum |
| EtOAc | = | Ethyl acetate |
| g | = | gram |
| μg | = | microgram |
| μl | = | microliter |
| hr. | = | hour |
| $^{1}$H nmr | = | Proton Nuclear Magnetic Resonance |
| HMBC | = | $^{1}$H-detected Heteronuclear Multiple Bond Coherence |
| HMQC | = | $^{1}$H-detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence |
| Hz | = | Hertz |
| J | = | coupling constant |
| L | = | liter |
| $\lambda_{max}$ | = | wavelength at maximal absorption |

| | | |
|---|---|---|
| $M^+$ | = | molecular iron |
| mg | = | milligram |
| min | = | minute |
| ml | = | milliliter |
| MHz | = | megahertz |
| m/z | = | mass to charge ratio |
| MS | = | mass spectrometry |
| mm | = | millimeter |
| nm | = | nanometer |
| NMR | = | Nuclear Magnetic Resonance |
| PCU | = | Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University |
| ppm | = | part per million |
| s | = | singlet |
| TLC | = | Thin Layer Chromatography |
| uv | = | ultraviolet |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย