

สารต้านเชื้อรา *Candida albicans* จาก *Streptomyces* species ที่แยกได้จากดิน

นางสาว สิรินรินทร์ จตุจินดา



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชเวท ภาควิชาเภสัชเวท

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-639-769-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตศึกษาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 193 27002

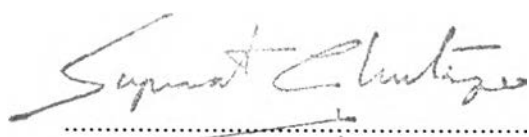
**ANTIFUNGAL AGENTS AGAINST *CANDIDA ALBICANS* FROM
STREPTOMYCES SPECIES ISOLATED FROM SOIL**

MISS SIRININ CHATUJINDA

**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
Academic Year 1998
ISBN 974-639-769-9**


Thesis Title Antifungal agents against *Candida albicans* from *Streptomyces*
species isolated from soil.
By Miss Sirinin Chatujinda
Department Pharmacognosy
Thesis Advisor Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, M.Sc. in Pharm.
Thesis Co-Advisor Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.

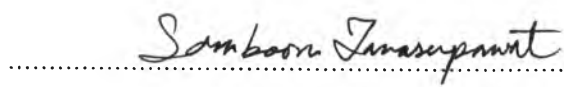
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

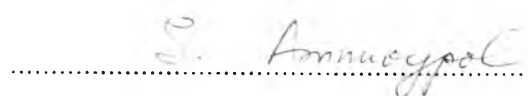

..... Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee


..... 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 Surattana Amnuoypol, M.Sc. in Pharm.)

สิรินันท์ จตุจินดา : สารต้านเชื้อรา *Candida albicans* จาก *Streptomyces* ที่แยกได้จากดิน
(ANTIFUNGAL AGENTS AGAINST *CANDIDA ALBICANS* FROM *STREPTOMYCES* SPECIES
ISOLATED FROM SOIL) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ชัยโย ชัยชาญทิพย์ทร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.
สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 95 หน้า, ISBN 974-639-769-9

ได้ทำการศึกษาเชื้อ *Streptomyces* จากดินโดยแยกตัวอย่างดินจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย
รวม 24 ตัวอย่าง ได้เชื้อ *Streptomyces* 35 ไอโซเลท จากผลการคัดเลือกความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ
บนอาหารแข็ง YM ของเชื้อโดยวิธี cross streak plate พบว่าเชื้อสายพันธุ์ CB5-3 ให้ผลยับยั้งการเจริญของ
Candida albicans ATCC 10231 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี พิสูจน์
ได้ว่าเชื้อ CB5-3 เป็น *Streptomyces hygroscopicus* นอกจากนี้นำเชื้อ CB5-3 ไปผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว
และสกัดแยกน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยไอโซบิวทานอลจากเชื้อสายพันธุ์นี้ พบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้าน *Candida albicans* ATCC
10231 มี R_f value = 0.7 จึงทำการแยกสกัดโดยวิธีทางโครมาโตกราฟีได้ fraction ต่างๆ นำไปทดสอบฤทธิ์ใน
การยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* โดยวิธี agar disc diffusion

ภาควิชา เกษตรศาสตร์
สาขาวิชา เกษตรศาสตร์
ปีการศึกษา 2541

ลายมือชื่อนิสิต *Sirinant Chatujinda*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *Chaiyo Chaichantiputh*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม *[Signature]*

C875541 : MAJOR PHARMACOGNOSY

KEY WORD: Antibiotics / Antifungal agents / *Candida albicans* / *Streptomyces* / *Streptomyces hygroscopicus*

SIRININ CHATUJINDA : ANTIFUNGAL AGENTS AGAINST *CANDIDA ALBICANS* FROM *STREPTOMYCES* SPECIES ISOLATED FROM SOIL. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. CHAIYO CHAICHANTIPYUTH, M.Sc. in Pharm., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMBOON TANASUPAWAT, Ph.D. 95 page, ISBN 974-639-769-9

Thirty five isolates of *Streptomyces* from 24 soil samples in Thailand were found to be able to produce antibiotics. Only *Streptomyces* sp. CB5-3 could inhibit the growth of *Candida albicans* ATCC 10231. Based on the results of morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics, the strain CB5-3 was identified as *Streptomyces hygroscopicus*. The isobutanol extract was tested by bioautographic method and found that the active spot was shown at R_f value =0.7. The extract was isolated by chromatographic method and was shown to be active against *Candida albicans* ATCC 10231.

ภาควิชา.....เภสัชเวช.....

สาขาวิชา.....เภสัชเวช.....

ปีการศึกษา 2541.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*Chaiyo Chaichantipyuth*.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*Somboon Tanasupawat*.....



ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to take this opportunity to express my sincere thank to Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, who acted as my advisor during the master degree education, with his enormous knowledge and experience in the field of pharmacognosy and chemistry, many scientific problems which were beyond my knowledge had been solved following his guidance. I am greatly indebted to him for his endless support, inspiration and valuable advice.

I would also like to acknowledge my thanks to my thesis co-advisor, Associate Professor Dr. Somboon Tanasupawat of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for his concern, kindly assistance and valuable advice.

I am very grateful to Associate Professor Dr. Kittisak Likhitwitayawuid, the chairman and Associate Professor Surattana Amnuoypol a member of my thesis committee for their valuable suggestion.

I am so much indebted to Departments of Pharmacognosy and Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University for providing facilities during my study.

Finally, I wish to express my infinite gratitude to my family and my lovely friends for their love, understanding and encouragement throughout this graduate study.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT OF THAI.....	iv
ABSTRACT OF ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF TABLES.....	x
ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEW.....	4
1. Review of Antibiotics.....	4
1.1 Antibiotics from <i>Streptomyces</i>	7
1.2 Antifungal antibiotics from <i>Streptomyces</i>	8
1.3 Antibiotics from <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	9
2. Review of the genus <i>Streptomyces</i>	12
2.1 Classification of <i>Streptomyces</i>	12
2.2 Genus <i>Streptomyces</i>	12
2.3 Distribution of <i>Streptomyces</i>	16
2.2 Criteria used for the classification and identification of <i>Streptomyces</i> species.....	18
3. Fermentation.....	24
4. Thin layer chromatography.....	26
5. Bioautographic detection of antibiotic in preparation chromatogram.....	26
III MATERIALS AND METHODS.....	27
1. Isolation of <i>Streptomyces</i> strains.....	27
2. Screening of antibiotics.....	27
3. Identification of strains.....	28
3.1 Morphological and cultural characteristics.....	28

CONTENTS (Cont.)

	Page
3.2 Physiological and biochemical characteristics.....	30
4. Antibiotics production.....	34
4.1 Organism.....	34
4.2 Method of cultivation.....	34
4.3 Antibiotic assay.....	35
4.4 Effect of pHs on antibiotic production.....	35
5. Separation of compounds.....	35
6. Isolation of compounds.....	38
IV RESULTS.....	41
1. Isolation of <i>Streptomyces</i> strains.....	41
2. Screening of antibiotic producing <i>Streptomyces</i>	42
3. Identification of strains.....	44
3.1 Morphological and cultural characteristics.....	44
3.2 Physiological and biochemical characteristics.....	51
4. Antibiotic production.....	55
5. Extraction.....	57
V DISCUSSION.....	58
VI CONCLUSION.....	60
REFERENCES.....	61
APPENDIX.....	73
VITA.....	82

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Antibiotics from <i>Streptomyces</i>	7
2	Antifungal antibiotics from <i>Streptomyces</i>	8
3	Antibiotics from <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	9
4	Criteria used for the classification and identification of <i>Streptomyces</i> species.....	23
5	Media and conditions for antibiotic production of <i>Streptomyces</i> <i>hygrosopicus</i>	25
6	Combined fractions from the isobutanol extract.....	38
7	Combined fractions from fraction A1/6-8, A1/9-23, A2/6-11 and A2/12-40.....	39
8	Combined fraction from fraction B1/6, B2/6, B2/7, B3/1, B4/1 and B4/5.....	39
9	Source of <i>Streptomyces</i> strains.....	41
10	Antimicrobial activity of <i>Streptomyces</i> strains.....	43
11	Morphological characteristics of <i>Streptomyces</i> strains on YM media.....	44
12	Cultural characteristics of <i>Streptomyces</i> strains on YM media.....	46
13	Cultural characteristics of <i>Streptomyces</i> strains on various media.....	48
14	Cultural characteristics of <i>Streptomyces</i> sp. CB5-3 on various media.....	49
15	Carbon utilization of <i>Streptomyces</i>	51
16	Carbon utilization of <i>Streptomyces</i> sp. CB5-3.....	52
17	Biochemical characteristics of <i>Streptomyces</i>	53
18	Physiological and biochemical characteristics of <i>Streptomyces</i> sp. CB5-3.....	55
19	Antibiotic production in different media.....	55
20	Antimicrobial activity of <i>Streptomyces</i> sp. CB5-3.....	56

LIST OF TABLES (Cont.)

Table		Page
21	Effect of pHs on activity against <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 of <i>Streptomyces</i> CB5-3.....	57
22	Activity testing of fractions against <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	57

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	The colonial appearance of <i>Streptomyces</i> sp. CB5-3 on PCA (dilute 10 %)	49
2	Scanning electromicrograph of <i>Streptomyces</i> sp. CB5-3 on PCA (dilute 10%)	50
3	Scanning electromicrograph of <i>Streptomyces</i> sp. CB5-3 on YM agar	50

LIST OF SCHEMES

Scheme		Page
1	Isolation of isobutanol extract from <i>Streptomyces</i> sp. CB5-3	40

ABBREVIATIONS

ATCC	= American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A.
µg	= microgram
µl	= microliter
°C	= degree celsius
Fig.	= Figure
g	= gram
l	= liter
mg	= milligram
ml	= milliliter
mm	= millimeter
No.	= number
PCU	= Departmenet of Microbiology Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University
rpm	= revolution per minute
sp.	= species
TLC	= Thin Layer Chromatography
UV	= Ultraviolet