



Cytotoxic Compounds from Marine Gliding Bacteria in Thailand

Yutthapong Sangnoi

T

เลขานพ.	QR 61.5 Y87 2008
Bib Key	305446
	7 9 S.A. 2552

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy in Biotechnology

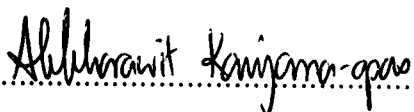
Prince of Songkla University

2008

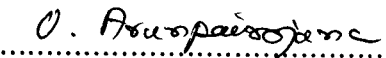
Copyright of Prince of Songkla University


Thesis Title Cytotoxic Compounds from Marine Gliding Bacteria in Thailand
Author Mr. Yutthapong Sangnoi
Major Program Biotechnology

Major Advisor



.....
(Dr. Akkharawit Kanjana-Opas)


Co-advisor

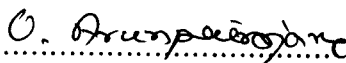

.....
(Dr. Vullapa Arunpairojana)



.....
(Asst. Prof. Dr. Anuchit Plubrukarn)

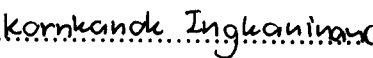
Examining Committee:


.....Chairperson
(Assoc. Prof. Dr. Aran H-Kittikun)



.....Committee
(Dr. Akkharawit Kanjana-Opas)


.....Committee
(Dr. Vullapa Arunpairojana)


.....Committee
(Dr. Ampaitip Sukhoom)


.....Committee
(Assoc. Prof. Dr. Kornkanok Ingkaninan)

The Graduate School, Prince of Songkla University, has approved this thesis as partial fulfillment of the requirements for the Doctor of Philosophy Degree in Biotechnology


.....
(Assoc. Prof. Dr. Kerkchai Thongnoo)

Dean of Graduate School

ชื่อวิทยานิพนธ์ สารออกฤทธิ์ต่อเซลล์จากไกลดิ้งแบคทีเรียในทะเลของประเทศไทย
ผู้เขียน นายยุทธพงษ์ สังข์น้อย
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2550

บทคัดย่อ

แบคทีเรียไกลดิ้งทั้งหมด 27 สายพันธุ์ แยกได้จากตัวอย่างชนิดต่างๆ ที่เก็บในทะเลบริเวณอ่าวไทย โดยพบว่าฟิล์มชีวภาพเป็นแหล่งที่ดีที่สุดในการแยกเชื้อชนิดนี้ รองลงมาคือ ฟองน้ำ ซากพืช สาหร่าย และกระดองปู ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิค subculture และการใช้ micromanipulator เป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการแยก และทำบริสุทธิ์เชื้อกลุ่มนี้ จากการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนยีนส์ 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียไกลดิ้งที่ใช้ในการศึกษาสามารถจำแนกได้เป็น 6 กลุ่ม ซึ่งทั้งหมดเป็นสมาชิกในกลุ่มเชื้อ *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteriodes* (CFB) โดยแบคทีเรียไกลดิ้งในกลุ่มที่ 1, 4, 5 และ 6 มีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นแบคทีเรียไกลดิ้งสกุลใหม่ โดยที่แบคทีเรียไกลดิ้งในกลุ่มที่ 4, 5 และ 6 นั้นได้รับการจัดจำแนกเป็นแบคทีเรียไกลดิ้งสกุลใหม่เรียบร้อยแล้ว คือ *Rapidithrix thailandica* gen. nov., sp. nov., *Aureispira marina* gen. nov., sp. nov. และ *Aureispira maritima* sp. nov. ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียไกลดิ้งในกลุ่ม 2 นั้นมีความเหมือนกับ *Tenacibaculum mesophilum* ในขณะที่แบคทีเรียไกลดิ้งในกลุ่ม 3 อาจเป็นไปได้ที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Fulvivirga kasyanovii* และจากการศึกษาความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer, HeLa) มะเร็งลำไส้ (colon cancer, HT-29) มะเร็งช่องปาก (oral cancer, KB) และมะเร็งเต้านม (breast adenocarcinoma, MCF-7) ของแบคทีเรียไกลดิ้งที่แยกได้ทั้งจากงานวิจัยนี้ และที่มีอยู่แล้วในคลังสายพันธุ์เชื้อ พบว่าแบคทีเรียไกลดิ้งในกลุ่มที่ 2 และ 4 มีความสามารถในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีทั้ง 4 ชนิด ส่วนแบคทีเรียไกลดิ้งในกลุ่มที่ 6 และกลุ่มที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้เพียง 2 ชนิด คือ HeLa และ HT-29 ตามลำดับ ซึ่งต่างจากแบคทีเรียไกลดิ้งในกลุ่มที่ 1 และ 5 ที่ไม่พบว่ามีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้เลย จากการศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง พบว่าอาหารชนิด CY ให้จำนวนสารสกัดยับยั้งเซลล์มะเร็งมากที่สุดคือ 23 ตัวอย่าง รองลงมาคืออาหารชนิด SK (11 ตัวอย่าง) RL (8 ตัวอย่าง) และ Vy/2 (7 ตัวอย่าง) ตามลำดับ และจากการศึกษาการแยก

สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากแบคทีเรียโกลดคิงจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Rapidithrix thailandica* (TISTR1768) *Rapidithrix thailandica* (TISTR1741) และ *Tenacibaculum mesophilum* (TISTR1782) พบว่าสามารถแยกสารชนิดต่างๆ ได้ทั้งหมด 9 สาร ประกอบด้วย cyclo(L-Pro-D-Phe) [G1], cyclo(L-Pro-L-Phe) [G2], *N*-(2-phenylethyl) acetamide [G3], cyclo(L-Pro-D-Tyr) [G5], cyclo(L-Pro-L-Tyr) [G6], cyclo(8-hydroxy-L-Pro-L-Leu) [G7], cyclo(8-hydroxy-L-Pro-D-Phe) [G8] และสารชนิดใหม่จำนวน 2 สารคือ 3-(2'-aminophenyl)-pyrrole [G4] และ 3-(2-Aminophenyl)-5-methoxy-1,5-dihydro-pyrrol-2-one [G9] และจากการนำสารที่แยกได้จำนวน 4 สาร คือ cyclo(L-Pro-D-Phe) [G1], cyclo(L-Pro-L-Phe) [G2], *N*-(2-phenylethyl) acetamide [G3] และ 3-(2'-aminophenyl)-pyrrole [G4] มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (IC_{50}) พบว่าสาร *N*-(2-phenylethyl) acetamide [G3] และ 3-(2'-aminophenyl)-pyrrole [G4] มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งในระดับปานกลาง ขณะที่สาร cyclo(L-Pro-D-Phe) [G1] และ cyclo(L-Pro-L-Phe) [G2] ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

Thesis Title Cytotoxic Compounds from Marine Gliding Bacteria in Thailand
Author Mr. Yutthapong Sangnoi
Major Program Biotechnology
Academic Year 2007

ABSTRACT

Twenty-seven strains of marine gliding bacteria were isolated from the specimens collected from coastlines in the Gulf of Thailand. It was found that biofilms provided the highest number of isolates followed by sponges, plant materials, algae and crab carcass. Subculturing and micromanipulation techniques were the most appropriate purification and isolation techniques for gliding bacteria in this study. Based on 16S rRNA gene sequence and phylogenetic analyse, the representative isolates were identified and classified to six different groups within the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteriodes* (CFB) group. Because of their similarities in 16S rRNA gene sequences, Groups 1, 4, 5 and 6 were proposed as novel genera including *Rapidithrix thailandica* gen. nov., sp. nov. (Gr. 4), *Aureispira marina* gen. nov., sp. nov. (Gr. 5) and *Aureispira maritima* sp. nov. (Gr. 6). Group 2 was identified as *Tenacibaculum mesophilum* whereas group 3 could potentially be a new species within *Fulvivirga kasyanovii*. During the course of cytotoxicity screening, forty-two marine gliding bacterial isolates were cultivated in four cultivation media (Vy/2, RL 1, CY and SK) and were screened for cytotoxicity against four human cell lines including cervical cancer (HeLa), colon cancer (HT-29), oral cancer (KB) and breast adenocarcinoma (MCF-7). The results showed that the members of groups 2 and 4 were capable of producing metabolites with cytotoxicities against all cell lines whereas the members of group 6 and the unidentified group could produce crude extracts with cytotoxicities against only HeLa and HT-29. Interestingly, groups 1, 3 and 5 could not produce any crude extracts with cytotoxicity. The CY medium was shown to be the most suitable medium for cytotoxic metabolites production yielding 23 cytotoxic extracts, followed by SK (11 extracts), RL 1 (8 extracts) and Vy/2 (7 extracts). Moreover, CY medium was the only medium which gave the active crude extract against MCF-7. Three extracts obtained from *Rapidithrix thailandica* (TISTR1768), *Rapidithrix*

thailandica (TISTR1741) and *Tenacibaculum mesophilum* (TISTR1782) were submitted to the bioassay guided fractionation in order to isolate and determine the compounds present in the extract. Nine metabolites including cyclo(L-Pro-D-Phe) [G1], cyclo(L-Pro-L-Phe) [G2], *N*-(2-phenylethyl) acetamide [G3], cyclo(L-Pro-D-Tyr) [G5], cyclo(L-Pro-L-Tyr) [G6], cyclo(8-hydroxy-L-Pro-L-Leu) [G7], cyclo(8-hydroxy-L-Pro-D-Phe) [G8] and two novel compounds, 3-(2'-aminophenyl)-pyrrole [G4] and 3-(2-Amino-phenyl)-5-methoxy-1,5-dihydro-pyrrol-2-one [G9], were isolated. Based on IC_{50} values *N*-(2-phenylethyl) acetamide [G3] and 3-(2'-aminophenyl)-pyrrole [G4] were considered moderately active against all four cell lines and three cell lines (HT-29, KB and MCF-7), respectively, whereas cyclo(L-Pro-D-Phe) [G1] and cyclo(L-Pro-L-Phe) [G2] exhibited no cytotoxicity.