ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตและการหาลักษณะเฉพาะของสารสีธรรมชาติจาก *Fusarium* sp. และ *Penicillium* sp.

ผู้เขียน นายคงศักดิ์ บุญยะประณัย

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล

บทคัดย่อ

มีการศึกษาจำนวนมากที่กล่าวถึงการสร้างสารสีของเชื้อรา ซึ่งบางส่วนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น สารแต่งสีในอาหาร ยารักษาโรค หรือแม้แต่เครื่องสำอาง เป็นต้น ในการศึกษานี้ได้คัดเลือกเชื้อราสองชนิด คือ *F. verticillioides* และ *P. purpurogenum* มาพัฒนาการผลิตสารสี และการนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เมื่อนำสารสีมาทำการทดสอบทางเคมีเพื่อยืนยันกลุ่มโครงสร้างของสารสี ก็พบว่า เชื้อ *P. purpurogenum* สร้างสารสีในกลุ่มของคาโรทีนอยด์ และควิโนน ซึ่งแตกต่างจากสารสีม่วงของ *F. verticillioides* ที่อยู่ในกลุ่มแนฟทรอควิโนน ทั้งนี้สารสีดังกล่าวจัดเป็นสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ เนื่องจากพบการสร้างมากในช่วง stationary phase สำหรับการพัฒนาการผลิตสารสีของเชื้อราทั้งสองโดยวิธีการปรับปรุงองค์ประกอบต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลปรากฏว่า *P. purpurogenum* สร้างสารสีได้มากที่สุดเมื่อถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย 30 g/l glycerol, 5 g/l peptone, 2 mM $MgSO_4$ และปรับ pH เริ่มต้นเป็น 8 (mPGB) ด้วยอาหารสูตรนี้ทำให้มีการผลิตสารสีแดงเพิ่มมากขึ้นถึง 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PDB เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที ส่วน *F. verticillioides* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร mPDB การสร้างสารสีจะสูงขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับอาหาร PDB ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ทั้งนี้อาหารสูตร mPDB ประกอบไปด้วย 200 g/l potato, 20 g/l glucose, 2.5 g/l yeast extract, 5 mg/l KH_2PO_4 และปรับ pH เริ่มต้นเป็น 8

ในการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการผลิตสารสีของเชื้อราทั้งสองในภาวะของการเลี้ยงแบบเซลล์ตรึงภายในเม็ดเจลของแคลเซียมแอลจิเนตและแบบเซลล์อิสระ จากผลการทดลองพบว่า การสร้างสารสีในเชื้อ *P. purpurogenum* มีประสิทธิภาพการผลิตสูงมากขึ้นประมาณ 3 เท่า เมื่อเทียบกับการเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ แต่กลับให้ผลตรงกันข้ามกับ *F. verticillioides* ที่พบว่าสารสีที่สะสมอยู่ในเม็ดเจลมีผลยับยั้งการสร้างสารสี ทำให้มีปริมาณการผลิตลดลงกว่า 8 เท่า

ในการหาระบบที่เหมาะสมสำหรับแยกสารสี โดย thin layer chromatography (TLC) พบว่า ระบบตัวพาที่ดีที่สุด คือ hexane : ethyl acetate : water : formic acid ในอัตราส่วน 2 : 6 : 1 : 1 สำหรับสารสีแดงของ *P. purpurogenum* ส่วนของ *F. verticillioides* ระบบตัวพาที่ดีที่สุด คือ ethyl acetate : methanol : formic acid ในอัตราส่วน 4 : 3 : 2 เมื่อนำระบบตัวทำละลายดังกล่าวมาใช้ในเทคนิค CC โดยใช้การชะแบบ step gradient elution จากองค์ประกอบที่แยกเก็บได้ทั้งหมด พบว่า องค์ประกอบส่วนใหญ่ที่ *P. purpurogenum* สร้างเป็นสารสีแดงที่มีขั้วมาก และมีบางส่วนที่เป็นสีเหลือง และม่วง ในขณะที่สารสีหลักที่แยกได้ของ *F. verticillioides* เป็นสารสีม่วง ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นสารสีชมพูแดงเมื่ออยู่ในสารละลายกรด อีกทั้งยังพบว่าเชื้อราชนิดนี้สร้างสารสีชมพูและเหลืองได้

ในการทดสอบสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพบางประการ พบว่า สารสีแดงจาก *P. purpurogenum* มีความสามารถในการทนความร้อน และการเปลี่ยนแปลง pH ได้ดีมาก เหมาะสำหรับพัฒนาไปเป็นสารสีย้อมได้ ซึ่งจากผลของการเตรียมเป็นสีย้อมก็ให้ผลการติดสีบนเส้นฝ้ายเป็นสีส้มจนถึงสีแดง นอกจากนี้สารสีแดงยังมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิด (*B. subtilis*, *E. coli*, *E. faecalis*, *V. cholera*, *Ps. aeruginosa*, *Ent. aerogenes*, *K. pneumonia* และ *M. smegmatis)* ในส่วนของสารสีม่วงจาก *F. verticillioides* ความสามารถในการละลายน้ำลดลงเมื่อได้รับความร้อน หรือ pH เปลี่ยนเป็นกรดมากขึ้น ดังนั้นถ้าจะให้มีเสถียรภาพมากขึ้นจึงควรเก็บในสารละลายเบส สำหรับสมบัติทางชีวภาพ พบว่า สารสีม่วงนี้ไม่มีสมบัติในการต้านทานการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้เลย แต่กลับสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL60 ได้ โดยมีความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เท่ากับ 16.47 µg/ml

จากผลการศึกษาทั้งหมดทำให้เห็นว่าเชื้อราทั้งสองชนิดมีความสามารถในการสร้างสารสีที่หลากหลายทั้งชนิด เฉดสี และสมบัติ ซึ่งสามารถใช้เทคนิคทางชีวภาพในการเพิ่มปริมาณการผลิตได้ ทำให้เชื้อราที่สร้างสีมีศักยภาพพอที่จะเป็นแหล่งของสารสีธรรมชาติได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Production and Characterization of Natural Pigments from *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp.

Author Mr. Kongsak Boonyapranai

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisor Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul

Abstract

Many studies have indicated the fungal pigment production. Some of these pigments are used in industrial enterprising as food additive, medicine, and also additive in cosmetic. In this study, two fungal species, *P. purpurogenum* and *F. verticillioides* were selected to develop pigment production and further applications. Crude pigments were classified in different groups according to their chemical structures. Pigments produced by *P. purpurogenum* were identified as derivatives of carotenoid and quinone. Differently, *F. verticillioides* produced only pigments of naphthoquinone group. These pigments were produced as secondary metabolites, confirmed by their production at stationary phase. Medium optimized techniques were systematically manipulated in shake flask culture to improve the pigment production. The results indicated that the pigment production of *P. purpurogenum* could be maximized by using a medium consisting of 30 g/l glycerol, 5 g/l peptone, 2 mM $MgSO_4$ with initial pH medium at 8 (mPGB). Under this condition, the red pigment was produced 6 times higher than the basal control medium (PDB) when cultivated for 5 days in shaking flask at 30°C, 200 rpm. Meanwhile, violet pigment production of *F. verticillioides* in optimized medium (mPDB) was 2 times superior to control medium (PDB) when cultivated in the same condition for 7 days. This mPDB medium consisting of 200 g/l of boiled white potatoes; 20 g/l of glucose; 2.5 g/l of yeast extract, supplemented with 5 mg/l of KH_2PO_4 and initial pH was adjusted at 8.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Productions of pigment by calcium alginate gel immobilization technique were also compared with freely suspended mycelia in shake flask fermentation. The results showed that pigment productivity in immobilized *P. purpurogenum* cultivation was 3 times greater than freely suspended cells. On the contrary, the immobilized *F. verticillioides*, accumulated pigment in gel bead causing inhibition of pigment production as evident that the production was 8-fold reduced.

Optimal condition for crude pigment separation by thin layer chromatography was also investigated. The best mobile phase system were solvent mixture of hexane : ethyl acetate : water : formic acid (2 : 6 : 1 : 1 in v/v) for pigments from *P. purpurogenum* and ethyl acetate : methanol : formic acid (4 : 3 : 2 in v/v) ffrom *F. verticillioides*. Both systems were applied in column chromatography by step gradient elution and all isolated pigments were collected. From collected fractions, most compounds produced by *P. purpurogenum* gave red polarity color whereas few amount of yellow and violet compound were discovered. The major pigment of *F. verticillioides* was violet which changing into pink-red pigment in acidic condition. Moreover, pink and yellow compound were also produced.

Some physical and biological properties of the pigments were evaluated. The red pigment produced by *P. purpurogenum* was stable at high temperature and various pH revealed its potential application as natural dye. Our finding demonstrated that the pigment could be fixed and gave orange to red shade on cotton yarn. Moreover, antibacterial activities of this pigment against *B. subtilis*, *E. coli*, *E. faecalis*, *V. cholera*, *Ps. aeruginosa*, *Ent. aerogenes*, *K. pneumonia* and *M. smegmatis* were exhibited. The violet pigment from *F. verticillioides* was decreased its water solubility when suffering in high thermal or more acidic condition. Thus, this pigment should be preserved in alkaline solution. In biological properties assay, the violet pigment has no anti-bacterial activity but could significant reduced the viability of the human promyelocytic leukemic (HL60) cell line with midpoint cytotoxicity (IC_{50}) values of 16.47 μg/ml.

In summary, both fungal strains could produce various types, shades and properties of pigments with the advantage of producing higher yield by biotechnological techniques. Both, pigmented-fungi are high potential used as natural pigment sources.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved