ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การผลิตรงควัตถุสีแดงจากรากยอป่าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและกระบวนการหมัก
ชื่อผู้เขียน	นาย วรวิทย์ ประหารริปูราบ
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. สุรีย์ ฟูตระกูล ประธานกรรมการ รศ. สรศักดิ์ เหลี่ยวไชยพันธุ์ กรรมการ อ. ดร. ดารารัตน์ ทองขาว กรรมการ

บทคัดย่อ

แอนทราควิโนน เป็นกลุ่มสารให้สีธรรมชาติที่พบในรากของพืชสกุล *Morinda* ซึ่งพบทั่วไปในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย และมีการใช้เป็นสีย้อมกันอย่างแพร่หลาย ในการวิจัยนี้ได้ทำการแสวงหาแนวทางในการเพิ่มผลผลิตสีย้อมธรรมชาติเพื่อผลิตสารให้สีดังกล่าว โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์รากยอป่าสายพันธุ์ *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib. และได้ทำการสกัดรงควัตถุสีแดงจากรากยอป่าด้วยเอธานอลพบสารประกอบหลัก 2 ชนิด ผลการตรวจสอบทางเคมีของสารทั้ง 2 ชนิด พบว่าเป็นสารประกอบแอนทราควิโนน และได้วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารให้สีหลักที่มีมากที่สุดโดยการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีคอลัมน์ และชะออกมาด้วยตัวชะผสมของเฮกเซน : คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 9/1 ทำการชะติดต่อกันไปเรื่อยๆด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Isocratic elution แล้วจึงทำการแยกบริสุทธิ์ต่อไปด้วยการตกผลึกซ้ำ ได้ผลึกที่มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม สีเหลืองอมส้ม การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบหลักด้วยยูวีวิสิเบิล สเปคโตรสโคปี แมส สเปคโตรสเมตรี และ C^{13} นิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์ สเปคโตรสโคปี พบว่าองค์ประกอบหลักนี้มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{10}O_5$ และมีโครงสร้างทางเคมีเป็น morindone ส่วนสารให้สีหลักที่เหลือได้จากการสกัดด้วยน้ำด่างที่ค่าพีเอช 11.2 แล้วทำเป็นผงโดยการฉีดพ่นแห้ง แล้วสกัดสารให้สีด้วยคลอโรฟอร์ม และวิเคราะห์ด้วย TLC พบสารสีหลัก 2 ชนิด ชนิดหนึ่งมีค่า R_f ตรงกับที่สกัดด้วยเอธานอลตัวที่ไม่ใช่ morindone ซึ่งยังไม่ได้วิเคราะห์โครงสร้าง จึงแยกบริสุทธิ์ด้วย preparative TLC และโครมาโทกราฟีคอลัมน์เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างต่อไป

การเพาะกลุ่มเซลล์รากยอป่านั้นได้ใช้เซลล์รากปลอดเชื้อได้มาจากการเจริญของเมล็ดรากยอป่าบนอาหาร MS การชักนำให้เกิดแคลลัสทำโดยตัดรากออกเป็นชิ้นเล็กๆยาว 2.5 มม. วางชิ้นส่วนลงบนอาหาร MS จนกระทั่งมีกลุ่มเซลล์เกิดขึ้น จึงนำมาเขี่ยเซลล์ลงบนอาหาร Gamborgs' B_5 ที่ 25 °ซ เป็นเวลา 1 เดือน เซลล์รากมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ มีสีเหลือง ได้ทำการสกัดสารให้สีด้วยคลอโรฟอร์ม และวิเคราะห์ด้วย TLC พบว่ามีสารให้สีหลัก 2 ชนิด โดยชนิดหนึ่งคือ Morindone ส่วนอีกชนิดหนึ่งได้ทำการแยกโดย preparative TLC ในน้ำยาชะคลอโรฟอร์ม : เมธานอล (9/1) และโครมาโทกราฟีคอลัมน์ และวิเคราะห์โครงสร้างของสารให้สี โดยยูวีวิสิเบิล และอินฟราเรดสเปคโตรสโคปีพบว่าใกล้เคียงกับกรดแอนทราฟลาวิค (2,6-dihydroxyanthraquinone) ซึ่งควรทำการยืนยันโครงสร้างทางเคมีโดยการวิเคราะห์ด้วย C^{13} นิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์ และ แมสสเปคโตรสเมตรีในโอกาสต่อไป เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณการผลิตสารสีกลุ่มแอนทราควิโนนโดยการเลี้ยงกลุ่มเซลล์รากยอป่าเป็นเวลา 3 เดือน และ 5 เดือน โดยทำการสกัดสารสีมาแยกด้วย TLC ในน้ำยาชะคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (9/1) และเทียบปริมาณโดยอาศัยความเข้มของแถบสีที่แยกบนแผ่น TLC โครมาโตแกรม โดยใช้เครื่อง densitometer พบว่า เซลล์รากยอป่าที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน จะมีน้ำหนักเซลล์เพิ่มขึ้น 2.6 เท่า และมีการผลิตสารสีเป็น 1.4 เท่าของกลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงเพียง 3 เดือน และเป็น 0.6 เท่า ของที่สกัดจากผงรากพืชที่มีอายุตั้งแต่ 2-3 ปีขึ้นไป ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์รากในอาหารเหลวที่ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 14-30 วัน พบว่าเซลล์รากเจริญช้ามาก มีจำนวนเซลล์ไม่พอที่จะนำมาสกัดเพื่อดูปริมาณการผลิตสี

Thesis Title	Production of Red Pigment from the Root of *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib. by Tissue Culture and Fermentation Process
Author	Mr. Worawit Praharnripoorab
M. S.	Biotechnology

Examining Committee	Assoc. Prof. Dr. Suree	Phutrakul	Chairman
	Assoc. Prof. Sorasak	Lhieochaiphant	Member
	Lect. Dr. Dararat	Tongkao	Member

Abstract

Anthraquinone is a group of natural red dye found in the root of *Morinda* sp. which is available in the upper north of Thailand and has been widely used on cotton dying. One alternative to increase the production of natural dye was culturing root cells of *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib. Two major components were found in ethanol extracted red pigment from the root of this plant. They were found to be in anthraquinone group by chemical test. The major components of the red pigment were obtained by separation on silica gel column chromatography eluted with a mixture of hexane/chloroform (9:1) by isocratic elution technique. Recrystallization of the major component gave orange needle shape crystals. Structural analysis of the purified major constituent by UV-visible spectroscopy, mass spectrometry and C^{13}-Nuclear magnetic resonance spectroscopy clearly indicated that the major constituent had chemical formula as $C_{15}H_{10}O_5$ and chemical structure as morindone. Another component was extracted with calcium hydroxide solution pH 11.2 and spray dried to powder which was extracted with chloroform and showed two major spots on TLC, one of which had R_f value the same as the other major component extracted with ethanol apart from

morindone. It was then purified by preparative TLC and column chromatography for structural analysis.

Sterilized root cells were obtained by growing the *Morinda* seed on MS medium. The roots were cut into 2.5 mm. pieces and grown in fresh MS medium to get callus which was fully proliferated on a modified Gamborgs' B_5 medium at 25 ^{o}C for 1 month. The pigments extracted from the cultured root cells with chloroform gave two major spots on TLC, one spot was morindone and the other was purified by preparative TLC eluted with chloroform : methanol (9:1) followed by column chromatography. The UV-visible and Infrared spectra of the purified component might be anthraflavic acid (2,6-dihydroxyanthraquinone) due to the same spectra as the reference data. However, confirmation of the chemical structure of this component by C^{13}-NMR and mass spectrometry should be done in the future. The amount of anthraquinone dye produced in the cell culture for 3 and 5 months were compared. Extraction of the pigment from the cultured cells and separated by TLC and eluted with chloroform : methanol (9/1). The density of major band separated by TLC chromatogram were compared with densitometer. It was found that the root cells cultured for 5 months increased 2.6 times of root cell weight and the pigment production was 1.4 times of the root cells cultured for 3 months and 0.6 times of the root powder of about 2-3 years old plant. The root cell was also cultured in shake flask of 100 rpm at 25 ^{o}C for 14 to 30 days. It was found that the root cell grew slowly and gave very low yield that was not enough for detection of the pigment production.