Thesis Title Production of Natural Pigments by Callus Cultures of Roots of *Morinda angustifolia* Roxb. and Leaves of *Indigofera tinctoria* Linn.

Author Mr. Paitoon Aobchey

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul	Chairperson
Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup	Member
Lecturer Dr. Dararat Tongkao	Member

ABSTRACT

Most natural dyes are plant-derived. Natural red dyes including the anthraquinones, naphthoquinones and benzoquinones can be found in varieties of plants. *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Criab. produces anthraquinone pigments in its root. The root pigment extracted with methanol and separated by thin layer chromatography eluted with a mixture of chloroform : methanol (9:1) gave two major components. One component was purified and identified as the anthraquinone pigment morindone. The root cells of *Morinda* plants cultured on a modified Gamborg's B_5 medium supplemented with 1 mg/l Naphthaleneacetic acid, 0.2 mg/l kinetin and 30 g/l sucrose at 25^{o}C for one month produced the pigments which gave two components on TLC using the same solvent system as that used for the separation of the pigment from the plant's root. The red pigment had R_f value the same as that of morindone and the yellow pigment was purified and identified as alizarin 1-methyl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ether. A high performance liquid chromatographic method was selected to determine morindone contents in root cell culture. Callus was extracted with chloroform and separated on a ZORBAX SB-C18 column. The eluent was monitored at 443 nm. The callus cultured in Gamborg's B_5 medium in the presence of 1 mg/l NAA, 0.2 mg/l kinetin and 30 g/l sucrose showed the maximum growth and the highest morindone production was 17.24 mg/g of dry cells.

Indigofera tinctoria Linn. has been used as natural source of indigo dye and is available in the upper northern part of Thailand. The major components of the indigo dye were found to be indigo and its isomer, indirubin, which gave maximum absorption at 600 and 552 nm, respectively. In this work, an HPLC method has been developed for the simultaneous characterization of indigo in the extract of *I. tinctoria* L. The indigo dye was separated on a Nucleosil 100-7 C18 column and measured with UV detection at 600 nm for indigo. Sterilized leaves were grown on Murashige and Skoog agar medium supplemented with 5 mg/l 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and 30 g/l sucrose. The plant cell culture was cultured at 25^{o}C in the dark and light conditions for 2 months. It was found that the leaf cells could produce white callus with both conditions and produced indican which could not be detected by the same method as indigo detection.

A method to quantify the indigo precursor indican (indoxyl-β-D-glucoside) from callus of *I. tinctoria* L. leaf has been developed. Callus was extracted in methanol and indican was identified and quantified using HPLC. The indican was separated on a Nucleosil 100-7 C18 column and measured with UV detection at 280 nm. The callus was grown on modified Murashige and Skoog agar medium supplemented with 4 mg/l 2,4-D and kinetin, 125 mg/l tyrosine and 30 g/l sucrose.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The plant cell was cultured at 25^{o}C in the dark condition for three weeks. Using the HPLC technique, callus indican content was quantified by comparing with standard indican. The indican content was 0.1070 mg/g (or indigo content was 0.0475 mg/g) of fresh weight of callus.

Indirubin is a red pigment found in indigo extract from Kram's leaves in approximately the same amount as indigo. A methanol extract of *I. tinctoria* Linn. powder was purified by two steps of silica gel 60 column chromatography and reverse phase high performance liquid chromatography using C18 column. The purified indirubin had molecular mass of 263 Da. In addition, the inhibitory effect of indirubin on MCF-7 human breast cancer cells showed that 30 μM indirubin strongly inhibited the cell growth of MCF-7 cells about 42% within 24 h. However, this study aims to improve production of these pigments from *M. angustifolia* Roxb. and *I. tinctoria* Linn. for the benefit of the textile industry.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตสารสีธรรมชาติโดยการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์รากยอป่าและใบคราม

ผู้เขียน นายไพฑูรย์ อบเชย

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร.หทัยชนก เนียมทรัพย์	กรรมการ
อ. ดร.ดารารัตน์ ทองขาว	กรรมการ

บทคัดย่อ

พืชเป็นแหล่งของสารให้สีธรรมชาติ สารสีดังกล่าวประกอบด้วยสารสีในกลุ่มแอนทราควิโนน แนพทราควิโนนและเบนโซควิโนน ซึ่งพบทั่วไปในพืชหลายชนิด อาทิเช่น รากยอป่าสายพันธุ์ *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib. ได้ทำการสกัดรงควัตถุสีแดงจากรากยอป่าด้วยเมทานอลและแยกด้วยโครมาโตกราฟีผิวบางในน้ำยาชะคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (9:1) พบสารสีหลัก 2 ชนิด ชนิดหนึ่งเมื่อทำการแยกบริสุทธิ์และวิเคราะห์โครงสร้าง พบว่าเป็นมอรินโดน การเพาะเลี้ยงเซลล์รากยอป่าบนอาหาร Gamborg'B_5 สูตรปรับปรุง ที่มี 1 mg/l Naphthaleneacetic acid (NAA), 0.2 mg/l kinetin และ 30 g/l sucrose ที่ 25°ซ เป็นเวลา 1 เดือน เมื่อแยกด้วยโครมาโตกราฟีผิวบางในน้ำยาชะเดียวกันกับการแยกสารสีจากราก พบว่ามีสารให้สีหลัก 2 ชนิด คือ สารสีแดงคือ มอรินโดนและสารสีเหลือง เมื่อทำการแยกบริสุทธิ์สารสีดังกล่าว พบว่าเป็น alizarin 1-methyl ether ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอนทราควิโนน ได้ศึกษาผลของสูตรอาหารต่างๆที่ใช้เพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์และศึกษาการผลิตมอรินโดน ซึ่งการหาปริมาณมอรินโดนจะใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยทำการสกัดกลุ่มเซลล์รากยอป่าด้วยคลอโรฟอร์มและวิเคราะห์สารดังกล่าวด้วยคอลัมน์ ZORBAX SB-C18 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 443 นาโนเมตร พบว่ากลุ่มเซลล์รากยอป่าที่เลี้ยงบนอาหาร Gamborg's B_5 ที่มี 1 mg/l NAA, 0.2 mg/l kinetin และ 30 g/l sucrose มีการเจริญของกลุ่มเซลล์มากที่สุดและมีการผลิตมอรินโดนสูงที่สุด เท่ากับ 17.24 มิลลิกรัมต่อกรัมของเซลล์แห้ง

คราม (*Indigofera tinctoria* Linn.) เป็นพืชที่ให้อินดิโก พบมากในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย มีองค์ประกอบหลัก คือ อินดิโกและอินดิรูบิน ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 และ 552 นาโนเมตร ตามลำดับ ได้สกัดครามเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณอินดิโกด้วยเทคนิค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ Nucleosil 100-7 C18 และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ศึกษาการเพิ่มผลผลิตสารให้สีอินดิโกด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชบนอาหารวุ้น Murashige and Skoog (MS) ที่มี 5 mg/l 2,4-D และ 30 g/l sucrose ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 2 เดือน ทั้งในสภาวะมืดและสภาวะที่มีแสงสว่าง พบว่ามีกลุ่มเซลล์สีขาวนวลเกิดขึ้นทั้งสองสภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ใบคราม

ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณอินดิแคน (indoxyl-β-D-glucoside) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตอินดิโกจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ใบคราม เมื่อนำกลุ่มเซลล์มาสกัดด้วยเมทานอลและหาปริมาณอินดิแคนด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์และระบบตัวชะเดิม และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นอกจากนี้ได้ศึกษาการปรับสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงกลุ่มเซลล์จากใบครามเพื่อใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ให้สั้นลง โดยใช้อาหารวุ้นสูตรปรับปรุงที่มี 2,4-D และ kinetin อย่างละ 4 mg/l, 125 mg/l tyrosine และ 30 g/l sucrose เลี้ยงในที่มืดที่ 25°ซ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบอินดิแคน เท่ากับ 0.1070 มิลลิกรัมต่อกรัม (หรือมีปริมาณอินดิโก เท่ากับ 0.0475 มิลลิกรัมต่อกรัม) ของเซลล์เปียก

อินดิรูบิน เป็นสารให้สีแดงที่ปนอยู่ในปริมาณใกล้เคียงกับอินดิโกในน้ำสกัดใบคราม พบว่าสารสกัดสีแดงจากผงครามที่สกัดด้วยเมทานอล เมื่อนำมาแยกและทำบริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีและเทคนิค RP-HPLC ด้วยคอลัมน์ C18 พบอินดิรูบินบริสุทธิ์ที่มีมวลโมเลกุล เท่ากับ 263 ดาลตัน นอกจากนี้พบว่าอินดิรูบินบริสุทธิ์มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 42% ในเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้การศึกษานี้คาดว่าจะสามารถนำไปประยุกต์ในการพัฒนาสารสีธรรมชาติที่ได้จากรากยอป่าและใบคราม เพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดของการนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมสีย้อมต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved