Thesis Title Natural Pigments from Microorganisms and Their Applications

Author Mrs. Siriwan Wichai

Ph.D. Biotechnology

Examining Committee

Assoc.Prof.Dr. Suree Phutrakul	Chairman
Lect.Dr. Bundit Leelasart	Member
Asst.Prof.Dr. Sirirat Sarawek	Member
Lect.Dr. Dararat Tongkao	Member
Assoc.Prof.Dr. Savitree Limtong	Member

ABSTRACT

Eighty-one isolates of pigmented microorganisms were isolated from natural sources by using spread plate technique with yeast extract malt extract agar, yeast extract peptone dextrose agar, potato dextrose agar and malt extract agar. From the total, 73 isolates were pigmented yeasts; 3 isolates as black yeasts; 4 isolates as pigmented molds and one isolate was red bacterium. All of pigments were classified in different groups according to their chemical structures by chemical methods. All of pigmented yeasts produced carotenoid and some isolates which produced carotenoid could also produced flavonoid. The four isolates of pigmented yeasts; 3B1, 3F2, 2A1 and 3R4, later identified as *Rhodotorula glutinis* produced higher carotenoid than the others. Black yeasts could produce melanin. Two isolates of pigmented molds produced

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

naphthoquinone and two isolates produced anthraquinone and flavonoid respectively. A red bacterium, *Serratia* sp., isolated from red mushroom produced high yield of pyrrole pigment.

The yeast cells isolates 3B1, 3F2 and 3R4 were treated with ethylmethane sulphonate (EMS), 30 μg/ml in the culture containing $2.03x10^8$ cells/ml for 1 hour. Sixteen isolates with different color of colonies mutants were collected and examined for production of carotenoids. The mutants showed different color colonies in deep-red, deep-pink, pink, pale pink, yellow and orange on yeast extract peptone dextrose agar. The selected mB34 mutant containing higher levels of carotenoids than the parent and the other isolated strains. HPLC analysis of the carotenoid compounds of the mutant mB34 revealed the occurrence of β-carotene, trans-astaxanthin and others. Media optimization in fermenter, the mB34 grew well and produced higher carotenoids pigment in yeast extract malt extract medium containing 0.3 % yeast extract, 0.3 % malt extract, 0.5 % peptone and 3 % glucose than the other concentrations. The total pigments and dry cell mass was 92.52 μg/g of yeast and 9.80 g/l, respectively at 72 hours.

An isolate of the red bacterium, *Serratia rubidaea* could produce high water-insoluble red pigment. The red pigment was easily extracted from cultures with acidic alcohol and then purified by silica gel column chromatography eluted with ethyl acetate and methanol. The orange pigment (PB) and purple pigment (PA) were obtained from using 100% ethyl acetate and 100% methanol as solvents elution respectively. The PA and PB were further purified and identified by HPLC, ESI-MS and H-NMR. The results showed that PB compound had a structure as prodigiosin ($C_{20}H_{25}ON_3$). Prodigiosin production was examined in various media including

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

nutrient agar, potato dextrose agar, yeast extract malt extract agar, peptone glycerol agar and modified media. Modified media, the cheap medium was prepared the same as potato dextrose agar but 1%glycerol was used as carbon source instead of glucose and 1% $(NH_4)_2SO_4$ as nitrogen source. It was found that pigment production in modified medium containing 30mM potassium phosphate buffer, pH 6.2 was higher than in the other medium. The optimum concentration of glycerol and $(NH_4)_2SO_4$ in this medium were found to be 1.5% and 0.3% respectively at 28°C with shaking 100 rpm and gave high yields of pigment up to 9.73 g/l at 36 hours of incubation time whereas in nutrient broth was 5.0 g/l at the same incubation time. Moreover, isolated bacterium *Serratia* immobilized on polyester sponge and cultivated in the submerge fermentation in modified medium showed the maximum pigment yield as 26.84 g/L which was approximately 3-folds of free cells in the same media. The purified prodigiosin, 5 and 10 μg/ml induced a significant decrease in the viability of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. The chemical properties of the pigment were examined. The pigment was a pH indicator, being red in acid solution and yellow-orange in alkaline. Upon heating of the pigment in water bath for 120 min at 90°C, it could be stable which indicated the possibility for using as natural dye. Our finding demonstrated that the pigment could be fixed and gave the same purple shade on cotton yarn when tested them in different mordants and processes. Since the pigment can be mass-produced by culturing, the medical application and the natural dye from this bacterium may become promising.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ รงควัตถุธรรมชาติจากจุลินทรีย์และการนำไปใช้ ประโยชน์

ชื่อผู้เขียน นางศิริวรรณ วิชัย

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล	ประธานกรรมการ
อ.ดร.บัณฑิต ลีละศาสตร์	กรรมการ
ผศ.ดร.ศิริรัตน์ สาระเวก	กรรมการ
อ.ดร.ดารารัตน์ ทองขาว	กรรมการ
รศ.ดร.สาวิตรี ลิ่มทอง	กรรมการ

บทคัดย่อ

สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างรงควัตถุจากตัวอย่างธรรมชาติ ได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลท ด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง 4 ชนิด คือ yeast extract malt extract agar, yeast extract peptone dextrose agar, potato dextrose agar และ malt extract agar พบว่า ทั้งหมด 81 ไอโซเลท นั้นเป็น pigmented yeast 73 ไอโซเลท black mold 3 ไอโซเลท pigmented mold 4ไอโซเลท และ pigmented bacterium 1 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของรงควัตถุที่สร้างโดยจุลินทรีย์ในแต่ละไอโซเลท พบว่า pigmented yeast ทุกไอโซเลทสร้างคาร์โรทีนอยด์ มีบางไอโซเลทเท่านั้นที่สร้างทั้งคาร์โรทีนอยด์และฟลาโวนอยด์ และสามารถคัดเลือกไอโซเลทที่สร้างคาร์โรทีนอยด์สูงสุด 4 ไอโซเลท คือ 3B1, 3F2, 2A1 และ 3R4 โดยทั้งหมดเป็น *Rhodotorula glutinis* สำหรับ black yeast พบว่ามีการสร้างและสะสมเมลานินในเซลล์ ส่วน pigmented mold

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทั้ง 4 ไอโซเลทนั้น พบว่า มี 2 ไอโซเลท สร้าง naphthoquinone และอีก 2 ไอโซเลทสร้าง anthraquinone ส่วน pigmented bacterium ที่แยกได้จัดอยู่ใน genus *Serratia* สร้าง pigment สีแดงในกลุ่ม pyrrole

ได้ทำการกลายพันธุ์ pigmented yeast 3 ไอโซเลท คือ 3B1, 3F2 และ 3R4 ด้วย ethyl methane sulfonate (EMS) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ $2.03x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าได้เชื้อกลายพันธุ์ที่ให้โคโลนีสีต่างๆกัน คือ แดงเข้ม แดง ชมพูเข้ม ชมพู ชมพูจางๆ เหลือง และสีส้ม และสามารถคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่สร้างรงควัตถุได้สูงสุดคือ mB34 และจากการวิเคราะห์รงควัตถุ โดยใช้ HPLC พบว่า เชื้อกลายพันธุ์ไอโซเลทดังกล่าวสร้าง เบต้าแคโรทีน (β-catotene) ทรานส์แอสทาแซนทิน (trans-astaxanthin) และคาร์โรทินอยด์กลุ่มอื่นๆ ได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคาร์โรทินอยด์ในถังหมักเบื้องต้นโดยปรับความเข้มข้นของสูตรอาหาร yeast extract malt extract medium พบว่า เชื้อกลายพันธุ์สามารถผลิตคาร์โรทินอยด์ได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ที่มีความเข้มข้นของ yeast extract และ malt extract เท่ากับ 0.3% ความเข้มข้นของ peptone เท่ากับ 0.5% และ glucose เท่ากับ 3% ซึ่งในสภาวะดังกล่าวเชื้อกลายพันธุ์สามารถผลิตคาร์โรทินอยด์ได้สูงสุด 92.52 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์ และเซลล์มีความเข้มข้น 9.80 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง

สำหรับ pigmented bacterium จัดจำแนกได้เป็น *Serratia rubidaea* ซึ่งสามารถผลิตรงควัตถุสีแดงอยู่ในเซลล์และไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่สามารถสกัดออกจากเซลล์ได้ง่ายโดยใช้สารละลาย acidic alcohol และนำมาทำให้บริสุทธิ์โดย column chromatography ที่มี ซิลิกาเจล และใช้ตัวชะที่เหมาะสม พบว่า สามารถแยกได้ 2 fractions คือ fraction ที่ให้สีส้ม (PB) ซึ่งชะออกได้ด้วย ethyl acetate 100% และ fraction ที่ให้สีม่วง (PA) ที่ใช้ตัวชะที่เหมาะสม คือ methanol 100% ทั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

PA และ PB สามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วย reverse phased HPLC และยืนยันโครงสร้างด้วย ESI-MS และ H-NMR พบว่า PB มีโครงสร้างเป็น prodigiosin ($C_{20}H_{25}ON_3$) สำหรับการผลิตรงควัตถุของแบคทีเรียที่แยกได้นั้นได้ทดสอบในอาหารแข็งหลายชนิด คือ nutrient agar, potato dextrose agar, yeast extract malt extract agar, peptone glycerol agar และ modified media พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตรงควัตถุได้ดีในอาหารแข็งที่มีราคาถูก คือ modified media ที่เตรียมโดยใช้มันฝรั่ง เช่นเดียวกับอาหาร potato dextrose agar แต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นกลีเซอรอลแทนกลูโคสและใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับในอาหารเหลวนั้นแบคทีเรียสามารถผลิตรงควัตถุได้ดีที่สุด 9.73 กรัมต่อลิตร ในอาหาร modified media ที่มีมันฝรั่ง 20% กลีเซอรอล 1.5% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.3% และ potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 30 มิลลิโมล พีเอช 6.2 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นอกจากนั้นการตรึงแบคทีเรียโดยใช้ฟองน้ำในอาหาร modified media พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตรงควัตถุได้สูงขึ้นกว่าเซลล์อิสระประมาณ 3 เท่า คือ 26.84 กรัมต่อลิตร จากการศึกษา cytotoxic effect ของรงควัตถุจากแบคทีเรียที่แยกได้พบว่า prodigiosin ที่มีความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้ง cell viability ของเซลล์มะเร็ง ชนิด human promyelocytic leukemia cell (HL-60) ในการศึกษาสมบัติทางเคมีของรงควัตถุ พบว่า รงควัตถุชนิดดังกล่าวมีสมบัติเป็น pH indicator และสามารถทนความร้อนได้ถึง 90°C ที่เวลามากกว่า 2 ชั่วโมง และได้ทดลองนำมาใช้เป็นสีย้อมธรรมชาติพบว่าด้ายฝ้ายติดสีชมพูอมม่วง ดังนั้นจากการที่เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ผลิตรงควัตถุได้มากในสภาวะที่ค้นพบจึงมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเป็นสีย้อมธรรมชาติได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved