Thesis Title Production of carotenoids from selected flowering plants and microorganisms

Author Miss Jidapha Tinoi

Degree Doctor of Science **(**Biotechnology)

Thesis Advisory Committee Assoc.Prof.Dr. Nuansri Rakariyatham Chairperson

Prof. Dr. Richard L. Deming Member

Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup Member

ABSTRACT

The production of carotenoids from selected flowering plants was investigated. The selected flowers are divided into four different families: Compositae (*Melampodium divaricatum*, *Cosmos bipinnatus* and *Tithonia diversifolia)*, Bignoniaceae (*Pyrostegia venusta* and *Tabebuia chrysantha*), Apocynaceae (*Allamanda cathartica* and *Theretia peruviana*) and Cannaceae (*Canna indica* Linn). The carotenoids in fresh and dried petals of selected flowers were separated, identified and quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) equipped with photodiode array detection and a C_{30} reversed-phase column. The identities were confirmed by mass spectrometry (LC-MS). The main carotenoids, lutein, neoxanthin, violaxanthin, zeaxanthin, β-carotene and β-cryptoxanthin in the petal extracts were identified by their retention times in HPLC, by their UV/Visible

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

absorption spectra and mass spectra compared to authentic standards. There are significant differences in the distribution percentages of the various carotenoid components depending on the colour and particular variety. Lutein was found to be present in largest amount (290.27 mg/100g) in petal extract of *Melampodium divaricatum*. In addition, β-carotene and β-cryptoxanthin were also found in the selected flower extracts. They are potentially good alternative sources of carotenoids for use as nutritional supplements and as food colorants.

Carotenoid production in *Xanthophyllomyces dendrorhous* in waste media from mustard by-product in allyl isothiocayanate production and mung bean waste from glass noodle production was investigated. Mustard meal extract (MME), mustard meal hydrolysate (MMH), mustard waste residue isolate extract (MRIE), mustard waste residue isolate hydrolysate (MRIH), mustard waste precipitated isolate extract (MPIE), mustard waste precipitated isolate hydrolysate (MPIH), mung bean waste extract (MBE) and mung bean waste hydrolysate (MBH) were prepared and used as substrates for growth and carotenoid production. Astaxanthin was found to be the major carotenoid in *X. dendrorhous* at 92% of the total carotenoids. The optimum conditions for growth and carotenoid production by *X. dendrorhous* cultured in waste media were 20% w/v of MME and MMH, 15% w/v of MRIE, MRIH, MPIE, MBE and MBH and 10% of MPIH, initial pH of 5.5, incubation temperature of 20°C and cultivation time of 120 h, except for MPIH at 96 h. The red yeast, *X. dendrorhous* grew best in MPIH medium and resulted in the highest yields of cell dry weight, total carotenoid and astaxanthin. These experiments demonstrate that the selected waste media are potential substrates for carotenoid produciton.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

The MPIH medium improved the growth and astaxanthin production by *X. dendrorhous* about 16-folds compared to the commonly used commercial yeast malt medium (YM medium), and 5-10 folds compared to other waste media. The supplementation of agro-industrial by-product extracts in waste media was studied. It was found that waste media supplemented with sweet potato extract produced the highest yields of cell dry weight, total carotenoid and astaxanthin.

The yeast, *Rhodotorula glutinis* was used to study the carotenoid production in selected waste media such as MME, MMH, MRIE, MRIH, MPIE, MPIH, MBE and MBH. The results showed that *R. glutinis* produced the highest total carotenoid when cultured in mustard waste precipitated isolate hydrolysate (MPIH) medium. Carotenoid production by *R. glutinis* cultured in waste media supplemented with the extracts from agro-industrial by-product was demonstrated and it was found that mung bean waste hydrolysate supplemented with sweet potato resulted in the highest growth and carotenoid produciton.

The sequential simplex method was employed for the optimization of growth and carotenoid production in the yeast *R. glutinis* using a substrate containing mung bean waste hydrolysate as the principal nitrogen source and sweet potato extract as the principal carbon source. Six experimental parameters were used: concentration of mung bean waste and sweet potato extract, pH, temperature, agitation rate and cultivation time. The sequential simplex method improved the growth and carotenoid production by *R. glutinis* compared to the traditional one-factor-at-a-time method. The results showed that cell dry weight and carotenoid content were 43% and 20%, respectively and were higher than those could be obtained by varying one factor at a time.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตคาโรทีนอยด์จากพืชดอกและจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว

ชื่อผู้เขียน นางสาวจิดาภา ทิน้อย

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. นวลศรี รักอริยะธรรม ประธานกรรมการ

Prof. Dr. Richard L. Deming กรรมการ

ผศ. ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์ กรรมการ

บทคัดย่อ

ในการทดลองได้ผลิตสารกลุ่มคาโรทีนอยด์จากดอกไม้ที่คัดเลือกแล้ว 4 วงศ์ คือ วงศ์ Compositae (*Melampodium divaricatum*, *Cosmos bipinnatus* and *Tithonia diversifolia)*, วงศ์ Bignoniaceae (*Pyrostegia venusta* and *Tabebuia chrysantha*), วงศ์ Apocynaceae (*Allamanda cathartica* and *Theretia peruviana*) และ วงศ์ Cannaceae (*Canna indica* Linn) คาโรทีนอยด์จากกลีบดอกไม้สดและแห้งที่คัดเลือกแล้ว จะถูกแยกพิสูจน์เอกลักษณ์และหาปริมาณโดยใช้เทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) ควบคู่กับเครื่อง photodiode array detector และใช้คอลัมน์ C_{30} reversed-phase ในการวิเคราะห์และบ่งชี้ชนิดของสารกลุ่มคาโรทีนอยด์ และการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

บ่งชี้สารยืนยันด้วยการใช้เทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี (mass spectrometry, MS) จากการศึกษาพบว่าสารกลุ่มคาโรทีนอยด์ที่พบเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ลูทีน (lutein), นีโอแซนทีน (neoxanthin), ไวโอลาแซนทีน (violaxanthin), ซีแซนทีน (zeaxanthin), เบต้า-คาโรทีน (β-carotene) และ เบต้า -คริปโตแซนทีน (β-cryptoxanthin) โดยได้เปรียบเทียบค่าเวลารีเทนชันจาก HPLC ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และมวลโมเลกุลจากแมสสเปกโทรเมตรี กับสารมาตรฐานคาโรทีนอยด์ ผลการศึกษาพบว่าปริมาณของสารคาโรทีนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบมีความแตกต่างกันระหว่างดอกไม้สดและดอกไม้แห้ง สีของกลีบดอกไม้และสายพันธุ์ของดอกไม้ และในดอกไม้วงศ์เดียวกันพบว่าสารคาโรทีนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารชนิดเดียวกันนอกจากนี้สารลูทีนเป็นสารคาโรทีนอยด์หลักที่พบในดอกไม้สดและแห้งในปริมาณสูง และพบมีปริมาณมากที่สุดในสารสกัดจากดอกไม้แห้งของ *Melampodium divaricatum* ในวงศ์ Compositae โดยมีปริมาณ 290.27 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้งของดอกไม้ และพบว่าสารเบต้า-คาโรทีน และ เบต้า-คริปโตแซนทีน เป็นสารคาโรทีนอยด์ที่พบในสารสกัดของกลีบดอกไม้ และมีปริมาณรองลงมาจากสารลูทีน จากงานวิจัยพบว่าในสารสกัดจากดอกไม้ที่คัดเลือกแล้วโดยเฉพาะในวงศ์ Compositae มีปริมาณของสารคาโรทีนอยด์ที่สำคัญเป็นองค์ประกอบและมีปริมาณสูง แสดงให้เห็นว่าดอกไม้ที่คัดเลือกแล้ว สามารถใช้เป็นแหล่งของสารคาโรทีนอยด์ที่สำคัญในทางการแพทย์และเภสัชกรรมรวมถึงอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ อีกแหล่งหนึ่งด้วย

ในการศึกษาได้ทำการผลิตสารกลุ่มคาโรทีนอยด์จากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* ในอาหารที่เตรียมจากกากมัสตาร์ด (mustard meal) และน้ำทิ้งมัสตาร์ด (mustard waste suspension) จากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด และกากโปรตีนถั่วเขียว (mung bean waste) จากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ทั้งหมด 8 ชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คือ mustard meal extract (MME), mustard meal hydrolysate (MMH), mustard waste residue isolate extract (MRIE), mustard waste residue isolate hydrolysate (MRIH), mustard waste precipitated isolate extract (MPIE), mustard waste precipitated isolate hydrolysate (MPIH), mung bean waste extract (MBE) และ mung bean waste hydrolysate (MBH) ถูกนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโตและผลิตคาร์โรทีนอยด์ จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *X. dendrorhous* สามารถเจริญเติบโตได้ดีและสามารถผลิตสารแอสตาแซนทีน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มคาโรทีนอยด์เป็นองค์ประ กอบหลัก โดยผลิตสารแอสตาแซนทีนได้ในปริมาณสูงถึง 92% เทียบกับปริมาณของสารคาโรทีนอยด์ทั้งหมด ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้คือ 20% w/v สำหรับ MME และ MMH 15% w/v สำหรับ MRIE, MRIH, MPIE, MBE และ MBH และ 10% w/v สำหรับ MPIH ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ยกเว้นเลี้ยงในอาหาร MPIH เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และจากการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MPIH สามารถเพิ่มความสามารถในการผลิตสารแอสตาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* ได้ และพบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MPIH สามารถเพิ่มความสามารถการผลิตสารแอสตาแซนทีนได้มากกว่าอาหารสังเคราะห์ถึง 16 เท่าและมากกว่าอาหารที่เตรียมได้จากของเหลือชนิดอื่นถึง 5-10 เท่า และการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MPIH ที่เติมสารสกัดจากมันเทศเพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอนนั้นพบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มความสามารถในการผลิตสารแอสตาแซนทีนได้มากกว่าเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

การผลิตสารคาโรทีนอยด์จากเชื้อ *Rhodotorula glutinis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากของเหลือทิ้งมัสตาร์ด และกากโปรตีนถั่วเขียว พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตสารคาโรที-นอยด์ได้มากที่สุดในอาหาร MPIH และเมื่อศึกษาการผลิตสารคาโรทีนอยด์ในอาหารที่มีการเติม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารสกัดจาก กล้วย ลำไย ข้าวโพด และมันเทศ พบว่าเชื้อ *R. glutinis* สามารถเจริญเติบโตได้มากที่สุดในอาหารที่เตรียมจากกากโปรตีนถั่วเขียวคือ MBH ที่มีการเติมสารสกัดจากมันเทศ และจากการศึกษาการเพิ่มความสามารถในการผลิตสารคาโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* พบว่าการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารโดยใช้วิธีซิมเพลกซ์ (Sequential simplex optimization) โดยมีตัวแปรทั้งหมด 6 ตัวแปร คือ ความเข้มข้นของอาหาร MBH ความเข้มข้นของสารสกัดจากมันเทศ พีเอชเริ่มต้นของอาหาร อุณหภูมิ ความเร็วในการเขย่า และเวลา โดยเปรียบเทียบกับการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีดั้งเดิม one-factor-at-a-time พบว่า การเจริญเติบโตของเชื้อและปริมาณของสารคาโรทีนอยด์ทั้งหมดที่ผลิตได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีซิมเพลกซ์ มีปริมาณสูงกว่าวิธี one-factor-at-a-time ถึง 43% และ 20% ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved