การเปลี่ยนโครงสร้างของไซคลิกเซสควิเทอร์พีนอยด์โดยทางชีวภาพ ด้วย *Aspergillus niger*

นางสาวนิสาชล เทศศรี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1044-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOTRANSFORMATION OF CYCLIC SESQUITERPENOIDS BY *Aspergillus niger*

Miss Nisachon Tedsree

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Botany

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1044-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนโครงสร้างของไซคลิกเซสควิเทอร์พีนอยด์โดยทางชีวภาพด้วย *Aspergillus niger*
โดย	นางสาวนิสาชล เทศศรี
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร ชวศิริ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์นันทนา อังกินันทน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร ชวศิริ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นิสาชล เทศศรี : การเปลี่ยนโครงสร้างของไซคลิกเซสควิเทอร์พีนอยด์โดยทางชีวภาพด้วย *Aspergillus niger* (BIOTRANSFORMATION OF CYCLIC SESQUITERPENOIDS BY *Aspergillus niger*) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. วรินทร ชวศิริ ; 70 หน้า. ISBN 974-53-1044-1

การเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของไซคลิกเซสควิเทอร์พีนอยด์ 2 ชนิดคือ pterocarpol และ valencene โดยอาศัย *Aspergillus niger* ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 7 วัน สกัดแยกผลิตภัณฑ์ด้วยไดเอทิลอีเทอร์และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี พบว่า *A. niger* ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ valencene ได้ แต่สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pterocarpol ได้ ด้วยการตรวจสอบด้วยเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี จากโครมาโทแกรมปรากฏจุดที่มีค่า R_f ต่างจากสารตั้งต้น 3 จุดคือ R_f 0.62, 0.45 และ 0.31 ตามลำดับ นำส่วนสกัดไดเอทิลอีเทอร์มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟฟีได้สารประกอบ 3 ชนิด โครงสร้างของสารประกอบทั้งสามพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคโปรตอนและคาร์บอน-13นิวเคลียร์แมคเนติกเรโซแนนซ์สเปกทรา พบว่ามีสูตรโครงสร้างเป็น $C_{15}H_{24}O_2$ (R_f 0.62) $C_{15}H_{26}O_3$ (R_f 0.45) และ $C_{15}H_{24}O_3$ (R_f 0.31) เป็นที่น่าสนใจว่าทั้ง $C_{15}H_{26}O_3$ และ $C_{15}H_{24}O_3$ เป็นสารประกอบตัวใหม่ซึ่งควรมีการศึกษาถึงสมบัติทางเคมีและชีวภาพต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา....พฤกษศาสตร์.....
สาขาวิชา.....พฤกษศาสตร์....
ปีการศึกษา.....2547.....

ลายมือชื่อนิสิต.....นิสาชล เทศศรี.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4472308723 : MAJOR BOTANY

KEY WORD: *Aspergillus niger* / BIOTRANSFORMATION / SESQUITERPENOIDS

NISACHON TEDSREE : BIOTRANSFORMATION OF CYCLIC SESQUITERPENOIDS BY *Aspergillus niger*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. WARINTHRON CHAVASIRI, Ph.D. 70 pp. ISBN 974-53-1044-1

Biotransformation of two cyclic sesquiterpenoids, pterocarpol and valencene was carried out using *Aspergillus niger*. After 7 days of incubation, the culture supernatant was extracted using diethyl ether and the products were assayed by thin layer chromatography (TLC). It was found that *A. niger* was not able to transform valencene but it was able to transform pterocarpol. The TLC chromatogram showed three spots with values of 0.62, 0.45 and 0.31. This extract was separated by column chromatography in to three products. Each product was analyzed using ^{1}H and ^{13}C-NMR spectroscopy. The spectroscopic data revealed that are three products had molecular formular as $C_{15}H_{24}O_2$ (R_f 0.62), $C_{15}H_{26}O_3$ (R_f 0.62) and $C_{15}H_{24}O_3$ (R_f 0.0.31). Interestingly, both $C_{15}H_{26}O_3$ and $C_{15}H_{24}O_3$ were found to be novel compounds which should be characterized for their properties chemical and biological.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department ....Botany.....

Field of study.....Botany.....

Academic year... 2004.....

Student's signature.....

Advisor's signature.....

CO-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆตลอดระยะเวลาทำงานวิจัย และได้กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร ชวศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และเอื้อเฟื้อวัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัยจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ ตลอดจนกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์นันทนา อังกินันทน์ ที่ได้กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ และรองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณวนิดา มั่นบรรจง ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ และช่วยเหลือเกี่ยวกับเทคนิคต่างๆทางด้านเคมี ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์สารเคมีและเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้อนุเคราะห์ทุนอุดหนุนการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์รวมทั้งบุคลากรในภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่าน และขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่ได้เอื้อเฟื้อและให้ความช่วยเหลือจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 15

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 15

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย..... 16

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 17

3.4 สารตั้งต้น..... 17

3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย..... 18

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 23

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ *Aspergillus niger* 23

4.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อ *A. niger*..... 24

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะปกติ
กับเมื่อใส่สารตั้งต้น..... 24

4.4 การตรวจหาผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโทรกราฟฟี..... 26

4.5 ภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนสารตั้งต้น..... 28

4.6 การสกัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pterocarpol..... 29

4.7 การทำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pterocarpol ให้บริสุทธิ์ 29

4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญของเชื้อกับผลิตภัณฑ์ PB ที่เกิดขึ้น..... 32

4.9 การวิเคราะห์สารที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อของ valencene ด้วยเทคนิคแก๊ส
โครมาโตกราฟฟี (GasChromatography)..... 32

4.10 การทำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนโครงสร้างของ pterocarpol ให้บริสุทธิ์
ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)..... 33

4.11 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์..... 33

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 46
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 51
รายการอ้างอิง..... 53
ภาคผนวก..... 57
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 70

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ชนิดของปฏิกิริยาไบโอทรานส์ฟอร์เมชันโดยจุลินทรีย์ 4
2 จำนวนหน่วยของ ไอโซพรีนและคาร์บอนอะตอมของเทอร์พีนอยด์แต่ละชนิด..... 9
3 ผลการแยกสารจากส่วนสกัดไดเอธิลอีเทอร์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทรกราฟฟี..... 29
4 แสดงร้อยละของผลิตภัณฑ์ PB ที่เกิดขึ้นและpterocarpolที่หายไป..... 31
5 แสดงฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของ pterocarpol และPB 33
6 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อราของ pterocarpol และ PB..... 34
7 เปรียบเทียบสัญญาณของคาร์บอน (δ, ppm) ของสารตั้งต้นกับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น..... 39
8 แสดงค่า chemical shift ของผลิตภัณฑ์ ด้วยการวิเคราะห์โดย HSQC เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม..... 40
9 แสดง HMBC Inverse Probe เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PA..... 41
10 แสดง HMBC Inverse Probe เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PB..... 42
11 แสดง HMBC Inverse Probe เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PC..... 43

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาเอพอกซิเดชันของ *cis*-propenylphosphonic acid โดย *Penicillum spinulosum*	5
2	การเปลี่ยน progesterone เป็น 11 α- hydroxyprogesterone โดย *Rhizopus nigricans*	6
3	การเปลี่ยน deoxycholic acid เป็น cortisone โดยวิธีทางเคมี	6
4	การเปลี่ยน ∝-pinene เป็น verbenone โดย *Aspergillums nige*…	7
5	การเปลี่ยน (s)-(+)-linalool โดย *A. niger* DSM 82	8
6	หน่วยไอโซพรีน	9
7	วิถีการเกิดสารเซสควิเทอร์พีนอยด์	10
8	การเปลี่ยน dehydropinguisenol โดยอาศัยเชื้อ *A.niger*	11
9	การเปลี่ยน (-)- maalioxide โดยอาศัยเชื้อ *A.niger* และ *A.cellulosae*	11
10	การเปลี่ยน β-และ γ- eudesmol โดยอาศัยเชื้อ *Gibberella suabinetti* ATCC 20193	13
11	การเปลี่ยน valencene โดยอาศัย *Gynostemma pentaphyllum*	14
12	โครงสร้างทางเคมีของ Pterocarpol	17
13	โครงสร้างทางเคมีของ Valencene	17
14	แผนแสดงผังการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ valencene ด้วย *A. niger*	22
15	แผนแสดงผังการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pterocarpol ด้วย *A. niger*	22
16	ลักษณะของโคโลนีของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงบน Potato Dextrose Agar เป็นเวลา 5 วัน	23
17	ลักษณะสปอร์ (A) และส่วนสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (B) ของ *A. niger*	23
18	การเจริญเติบโตของของ *A. niger*	24
19	การเจริญเติบโตของ *A. niger* ในสภาวะปกติ กับเมื่อใส่ pterocarpol	25
20	การเจริญเติบโตของ *A. niger* ในสภาวะปกติ กับเมื่อใส่ valencene	25
21	โครมาโทรแกรมแสดงผลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Pterocarpol ด้วย *A. niger* โดยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตต	26

รูปที่ หน้า

22 โครมาโทรแกรมแสดงผลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ valencene ด้วย *A. niger* โดยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซนกับเอธิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 8 : 2 27

23 โครมาโทรแกรมแสดงผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Pterocarpol โดย *A. niger* โดยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตต..... 28

24 โครมาโทแกรมของลำดับส่วนที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทรกราฟฟี ทดสอบด้วยเทคนิคTLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือเอธิลอะซิเตต..... 30

25 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของผลิตภัณฑ์PB ที่เกิดขึ้นกับของ pterocarpol ที่ลดลง... 31

26 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อกับผลิตภัณฑ์ PB ที่เกิดขึ้น..... 32

27 ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของ pterocarpol และ PB..... 33

28 ฤทธิ์การต้านเชื้อราของ pterocarpol และ PB..... 35

29 โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PA..... 36

30 คาร์บอน-13เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PA..... 36

31 โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PB..... 37

32 คาร์บอน-13เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PB..... 37

33 โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PC..... 38

34 คาร์บอน-13เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PC..... 38

35 แสดงการเรียกตำแหน่งของคาร์บอนในโมเลกุลของ pterocarpol..... 39

36 แสดงตำแหน่งโปรตอนและ คาร์บอนที่ coupling กันของผลิตภัณฑ์ PA..... 41

37 แสดงตำแหน่งโปรตอนและ คาร์บอนที่ coupling กันของผลิตภัณฑ์ PB..... 42

38 แสดงตำแหน่งโปรตอนและ คาร์บอนที่ coupling กันของผลิตภัณฑ์ PC..... 43

36 โครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ A..... 44

40 โครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ B..... 44

41 โครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ C..... 45

42 ปฏิกิริยาไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของ pterocarpol ด้วย *A.niger*..... 49

43 คาร์บอน-13เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ pterocarpol..... 62

44 โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ pterocarpol..... 63

รูปที่ หน้า

45 HSQC เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PA..... 64
46 HMBC เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PA..... 65
47 HSQC เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PB..... 66
48 HMBC เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PB..... 67
49 HSQC เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PC..... 68
50 HMBC เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PC..... 69

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย