ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
242323

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 3

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อผลิตภัณฑ์สุขภาพ

Production of Biosurfactant from Microorganism for Health Care Products

เสนอต่อ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

โดย

รองศาสตราจารย์พิมพร ลีลาพรพิสิฐ

หัวหน้าโครงการวิจัย

ได้รับทุนสนับสนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ. ศ. 2552

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
242323

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 3

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อผลิตภัณฑ์สุขภาพ

Production of Biosurfactant from Microorganism for Health Care Products

เสนอต่อ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

โดย

รองศาสตราจารย์พิมพร ลีลาพรพิสิฐ

หัวหน้าโครงการวิจัย

ได้รับทุนสนับสนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ. ศ. 2552

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยส่วนนี้เป็นรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อผลิตภัณฑ์สุขภาพซึ่งเป็นปีที่สาม โดยได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสำนักงานวิจัยแห่งชาติ (วช.) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ และขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมักและวิศวกรรมเคมี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และ Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna Austria สุดท้ายขอขอบคุณคณะวิทยาศาตร์และคณะเภสัชศาสตร์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์ใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ จนทำให้งานวิจัยในส่วนที่สองนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

คำนำ

โครงการวิจัยเรื่อง การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อผลิตภัณฑ์สุขภาพ ในส่วนที่สามประจำปี 2552 ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานวิจัยคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ซึ่งมีรายนามคณะนักวิจัยดังนี้คือ

1.	รศ. พิมพร ลีลาพรพิสิฐ	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2.	ศ.ดร. สายสมร ลำยอง	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3.	ผศ.ดร.ดำรงณ์ ศานติอาวรณ์	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4.	ดร. ไว ปทุมผาย	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ
5.	Professor Dr. Helmut Viernstein .	Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna Austria
6.	Professor Dr. Frank M.Unger .	Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna Austria
7.	นายสุรชัย เตชะเอ้ย	นักศึกษาปริญญาเอก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โครงการวิจัยนี้แบ่งเป็น 3 ส่วน (3 ปี) รายงานการวิจัยนี้เป็นรายงานในส่วนที่สามประจำปี 2552 ซึ่งส่วนที่ 3 เป็นการวิจัยที่ทำต่อเนื่อง เพื่อให้ครบวงจร

รายงานการวิจัยของโครงการวิจัยในส่วนที่สามนี้ยังแบ่งย่อยออกได้เป็น 7 ตอน คือ

ตอนที่ 1: การผลิต สกัดแยกสารบริสุทธิ์ และศึกษาโครงสร้างเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตอนที่ 2: การศึกษาคุณสมบัติการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตอนที่ 3: การศึกษาการระคายเคืองของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตอนที่ 4: การศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ: คุณสมบัติการทำให้เปียก การเกิดฟอง และการชำระล้าง (detergency) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตอนที่ 5: การศึกษาคุณสมบัติการก่ออิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตอนที่ 6: การศึกษาคุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตอนที่ 7: การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

242323

บทคัดย่อ

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* SCMU106 ซึ่งได้ศึกษาสภาวะการผลิตที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณภาพดีที่สุดมาแล้ว โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปั่นด้วยใบพัดความเร็ว 500 รอบต่อนาที 48 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออก แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer ได้ผงแห้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Freeze dried powder crude biosurfactant, FCBS) มีสีเหลือง จากนั้นนำมาแยกสกัด ทำให้บริสุทธิ์และทดสอบเอกลักษณ์ด้วยขบวนการทางเคมีวิธีต่างๆ เช่น การตกตะกอนด้วยกรดเข้มข้น HCl การทำปฏิกริยา hydrolysis และ methanolysis เป็นต้น รวมทั้งการใช้ TLC, Column chromatography, การตรวจวิเคราะห์ด้วย NMR และ ESI–MS พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้คือ RhaRha-C10C10 มีมวลโมเลกุลประมาณ 649 มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น dirhamnolipid จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้น พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพละลายได้ดีใน น้ำกลั่น, 1% Tween 80 และ glycerin ละลายได้เล็กน้อยใน propylene glycol และ ethanol ไม่ละลายใน mineral oil ไม่ก่อระคายเคืองเมื่อทดสอบ โดยวิธี Zein test มีคุณสมบัติในการทำให้เปียกที่ดีกว่า Sodium lauryl sulfate (SLS) มีคุณสมบัติในการเกิดฟองน้อยกว่า SLS แต่ให้ฟองที่ละเอียดกว่า มี detergency property ที่น้อยกว่า Tween 80 และ SLS (squalene titer point เท่ากับ 21.21, 27.03 และ 30.72 ตามลำดับ) คุณสมบัติการก่ออิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ น้อยกว่า Tween 80 และ SLS สำหรับ mineral oil และ kerosene แต่มากกว่า Tween 80 และ SLS สำหรับ Xylene ในกลุ่ม hydrocarbon oils แต่พบว่า สำหรับกลุ่ม vegetable oils (olive oil, soy bean oil , sun flower oil) นั้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ความเข้มข้น 0.5-1.5 % มีอำนาจในการก่ออิมัลชั่นน้อยกว่า Tween 80 และ SLS ในขณะที่ความเข้มข้น 2-10 % มีอำนาจในการก่ออิมัลชั่นใกล้เคียงกับ Tween 80 และ SLS การเพิ่มอุณหภูมิในการเตรียมจะช่วยเพิ่มอำนาจในการก่ออิมัลชั่นในทุกกรณี จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สามารถยับยั้งเชื้อ *β-hemolysis streptococcus group A, Staphylococcus aureus ATTC 29213, Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA)* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli ATCC 25922* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ โดยมีค่า MIC 0.39-25 mg/ml และ ค่า MBC 0.39-30 mg/ml ตามลำดับ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ โดยวิธี TBARS มีค่า IC_{50}= 9.3 mg/ml และวิธี DPPH มีค่า IC_{50}= 3.8 mg/ml ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันต่ำกว่าสารมาตรฐาน Quercetin, Kaempferol และ BHT.

ผลจากการวิจัยนี้สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* SCMU106 ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในอู่ซ่อมรถ ซึ่งมีประสิทธิภาพและปลอดภัย สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและความงามได้ต่อไป

242323

Abstract

The production of biosurfactant from bacterial strain SCMU 106 isolated from soil in garage which was preliminary studied for the optimal condition for the best production, in a 5 litre fermentor at 37 ^{0}C, stiring speed 500 rpm for 48 hours, after centrifuged and freeze dried the supernatant, a yellow powder crude biosurfactant, (BS) was obtained. This was then isolated, purified and identified by various chemical process such as precipitation with HCl , hydrolysis and methanolysis, including TLC, Column chromatography, NMR and LC-MS analysis. It was found that the purified compound in the produced biosurfactant was dirhamnolipid (RhaRha-C10C10, MW 649). From the physicochemical characterization, the biosurfactant was soluble in water, 1% tween 80 and glycerin, sparingly soluble in propylene glycol and ethanol, insoluble in mineral oil. No irritation was found from Zein test. It exhibited better wetting property than sodium lauryl sulfate (SLS). The biosurfactant showed less foaming property than SLS and less detergency property than tween and SLS (squalene titer point =21.21, 27.03 and 30.72, respectively). It also expressed good emulsification efficiency which was comparable to Tween 80 and SLS for vegetable oils (olive oil, soy bean oil , sun flower oil) at the concentration above 2.0% but less than Tween 80 and SLS at 0.5-1.5 %. And also showed lower emulsification efficiency than Tween 80 and SLS for some hydrocarbon oils (mineral oil and kerosene except xylene). The increasing of emulsification temperature also increased the emulsification efficiency in every tested oils. From the antibacterial activities test, were found that at 5% concentration, the biosurfactant was effective against *β-hemolysis streptococcus group A, Staphylococcus aureus ATTC 29213, Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA)* but was ineffective against *Escherichia coli ATCC 25922*. The MIC were 0.39-25 mg/ml and the MBC were 0.39-30 mg/ml. From antioxidant activities determination, were found that the biosurfactant possesed antioxidant activities with IC_{50}= 9.3 mg/ml for TBARS assay and IC_{50}= 3.8 mg/ml by DPPH assay, which were lower than Quercetin, Kaempferol and BHT.

The results from this study, can be concluded that biosurfactant was successively produced from *Pseudomonas aeruginosa* SCMU106 isolated from oil contaminated soil in garage which was safe and effective for the application in health care products and cosmetics in the future.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
คำนำ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	11
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	92
เอกสารอ้างอิง	94

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1: ค่า Rf ของสารมาตรฐานเทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหลังจากการทำ hydrolysis 43

ตารางที่ 4.2: ลักษณะที่ปรากฏของการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำกลั่น 49

ตารางที่ 4.3 ลักษณะที่ปรากฏของการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน propylene glycol (PG) 50

ตารางที่ 4.4: ลักษณะที่ปรากฏของการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน 1% Tween 80 51

ตารางที่ 4.5: ลักษณะที่ปรากฏของการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน glycerin 52

ตารางที่ 4.6: ลักษณะที่ปรากฏของการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในเอทานอล 53

ตารางที่ 4. 7: ลักษณะที่ปรากฏของการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน mineral oil 54

ตารางที่ 4.8: ผลการวิเคราะห์การระคายเคืองของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี zein test 55

ตารางที่ 4.9: ผลการวิเคราะห์การระคายเคืองของ Zein ด้วยวิธี Zein test 55

ตารางที่ 4.10: ลักษณะการเกิดฟองของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ณ เวลาต่างๆ 57

ตารางที่ 4.11: ลักษณะของการเกิดฟองของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ SLS 57

ตารางที่ 4.12 คุณสมบัติ detergency ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อเปรียบเทียบกับสาร ลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ 59

ตารางที่ 4.13: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 0.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง (E0) ณ อุณหภูมิห้อง 61

ตารางที่ 4.14: ลักษณะทางกายภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 0.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิห้อง 62

ตารางที่ 4.15: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 0.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิห้อง 64

ตารางที่ 4.16:ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 0.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง (E0) ณ อุณหภูมิ 75 °C 65

ตารางที่ 4.17: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 0.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ เวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิ 75 °C 66

ตารางที่ 4.18: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาขณะทำการทดลอง (E0) ณ อุณหภูมิห้อง 67

ตารางที่ 4.19: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิห้อง 68

หน้า

ตารางที่ 4.20: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง (E0) ณ 75 °C 69

ตารางที่ 4.21: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ 75 °C 70

ตารางที่ 4.22: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง (E0) ณ อุณหภูมิห้อง 71

ตารางที่ 4.23: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิห้อง 72

ตารางที่ 4.24: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง (E0) ณ 75 °C 73

ตารางที่ 4.25: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิ 75 °C 74

ตารางที่ 4.26: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 2% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง (E0) ณ อุณหภูมิห้อง 75

ตารางที่ 4.27: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 2% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิห้อง 76

ตารางที่ 4.28: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 2% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง (E0) ณ อุณหภูมิ 75 °C 77

ตารางที่ 4.29: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 2% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิ 75 °C 78

ตารางที่ 4.30: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง (E0) ณ อุณหภูมิห้อง 79

ตารางที่ 4.31: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิห้อง 80

ตารางที่ 4.32: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง (E0) ณ อุณหภูมิ 75 °C 81

ตารางที่ 4.33: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิ 75 °C 82

ตารางที่ 4.34 ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น **10%** ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง (E0) ณ อุณหภูมิห้อง 83

หน้า

ตารางที่ 4.35: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 10% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิห้อง 84

ตารางที่ 4.36: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 10% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิ 75 °C 85

ตารางที่ 4.37: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 10% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิ 75 °C 86

ตารางที่ 4.38: ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Agar cup ต่อเชื้อแบคทีเรีย 87

ตารางที่ 4.39: ค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อแบคทีเรียของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 88

ตารางที่ 4.40: ค่า IC_{50} ของตัวอย่าง Biosurfactant และสารมาตรฐาน เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS และ DPPH 89

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคไลปิด 6

รูปที่ 2.2: โครงสร้างของเซอแฟกตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* 7

รูปที่ 3.1: การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักขนาด 5 ลิตร 14

รูปที่3.2: ขั้นตอนการแยกสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากแบคทีเรีย 15
Pseudomonas aeruginosa SMU106 วิธีที่1

รูปที่ 3.3: ขั้นตอนการแยกและวิเคราะห์หากลุ่มชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้ 17
จากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* SMU106 วิธีที่2

รูปที่ 3.4: เครื่องโครมาโตกราฟีแบบอัตโนมัติ Linomat 4 LAMAG 20

รูปที่ 3.5: ก. แสดงตำแหน่งการวางวงแหวนอลูมิเนียมบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 26

รูปที่ 3.5: ข. แสดงการวัดขนาด Clear zone 26

รูปที่ 3.6: แสดงวิธีการหาค่า MIC 28

รูปที่ 3.7: แสดงวิธีการหา MBC 29

รูปที่ 4.1: ลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้หลังจาก การทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer 34

รูปที่ 4.2: ลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนเอทิลอะซิเตต หลังจากระเหยตัวทำละลาย 35
ออกภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator

รูปที่ 4.3: TLC pattern ของสารสกัดแยกส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ Lane 1= 35
Hexane extract Lane 2=Ethylacetate extract โดยใช้ mobile phase คือ CH_2Cl_2:MeOH = 9:1

รูปที่ 4.4 ปฏิกิริยาของน้ำตาลแรมโนสกับ orcinol 36

รูปที่ 4.5: NMR โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ fractionที่ 37

รูปที่ 4.6: NMR โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ fractionที่ 5 37

รูปที่ 4.7: NMR โครมาโตรแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ fraction ที่ 9 38

รูปที่ 4.8: TLC chromatogram ของสารที่ทดสอบ 1= น้ำตาลแรมโนส 2=สารลดแรงตึงผิว 39
ชีวภาพโดยใช้ mobile phase คือ acetonitril:water =17:3

รูปที่ 4.9: การหาระบบที่เหมาะสมต่อการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 40

รูปที่ 4.10: โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหลังจากผ่านกระบวนการ methanolysis 41

รูปที่ 4.11: โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหลังจากผ่านกระบวนการ methanolysis 41

รูปที่ 4.12: TLC pattrn ของ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี 42

รูปที่ 4.13: TLC โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหลังจากทำการ hydrolysis 44

รูปที่ 4.14: สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่ 40 °C 45

หน้า

รูปที่ 4.15: โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่คือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : กรดอะซิติก เท่ากับ 65 : 15 : 2 (v/v/v) และพ่นด้วย 15% H_2SO_4 45

รูปที่ 4.16: โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี 46

รูปที่ 4.17: การเปรียบเทียบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกบริสุทธิ์ (A) กับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำการไฮโดรไลซีส (B) โดยใช้สารละลายแรมโนสเป็นสารมาตรฐาน (C) 46

รูปที่ 4.18 :โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพวิเคราะห์โดยใช้ LC-MS 47

รูปที่ 4.19 : โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สร้างจากแบคทีเรีย SCMU106 48

รูปที่ 4.20: แสดงลักษณะของผลึกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ กำลังขยาย 10 เท่า ในกล้องจุลทรรศน์ 48

รูปที่ 4.21 : การละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 1:30, 1:10 และ 1:1 (w/v) ณ อุณหภูมิห้อง (ซ้าย) และ 60 °C (ขวา) เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 เดือน 49

รูปที่ 4.22: การละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน propylene glycol ที่ความเข้มข้น 1:30, 1:10 และ 1:1 (w/v) ณ อุณหภูมิห้อง (ซ้าย) และ 60 °C ขวา) เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 เดือน 50

รูปที่ 4.23: การละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน1% tween 80 ที่ความเข้มข้น 1:30, 1:10 และ 1:1 (w/v) ณ อุณหภูมิห้อง (ซ้าย) และ 60 °C ขวา) เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 เดือน 51

รูปที่ 4.24 : การละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน glycerin ที่ความเข้มข้น 1:30, 1:10 และ 1:1 (w/v) ณ อุณหภูมิห้อง (ซ้าย) และ 60 °C ขวา) เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 เดือน 52

รูปที่ 4.25: การละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน ethanol ที่ความเข้มข้น 1:30, 1:10 และ 1:1 (w/v) ณ อุณหภูมิห้อง (ซ้าย) และ 60 °C ขวา) เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 เดือน 53

รูปที่ 4.26: การละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน mineral oil ที่ความเข้มข้น 1:30, 1:10 และ 1:1 (w/v) ณ อุณหภูมิห้อง (ซ้าย) และ 60 °C ขวา) เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 เดือน 54

รูปที่ 4.27: ลักษณะของก้อนสำลีที่เปียกชุ่มหลังจากจุ่มในสารละลายลดแรงตึงผิวชีวภาพ น้ำ และ SLS ที่ความเข้มข้น 0.1% ณ อุณหภูมิห้อง 56

รูปที่ 4.28: เปรียบเทียบการเกิดฟองของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ SLS 58

รูปที่ 4.29: การเกิดฟองของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ขวา) ปรียบเทียบกับ SLS (ซ้าย)เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที 58

รูปที่ 4.30: การหายไปของเม็ดไขมันเมื่อหยดด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสังเคราะห์ โดยที่ A คือ Tween 80 , B คือ biosurfactant, C คือ control และ D คือ SLS 59

หน้า

รูปที่ 4.31: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 0.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิห้อง 61

รูปที่ 4.32: ลักษณะของอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น 0.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ 62

รูปที่ 4.33: ลักษณะของอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (SLS) ความเข้มข้น 0.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ 63

รูปที่ 4.34: ลักษณะของอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Tween 80 ความเข้มข้น 0.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ 63

รูปที่ 4.35: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 0.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิห้อง 64

รูปที่ 4.36: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 0.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิ 75 °C 65

รูปที่ 4.37: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 0.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ เวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิ 75 °C 66

รูปที่ 4.38: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิห้อง 67

รูปที่ 4.39: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิห้อง 68

รูปที่ 4.40: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิ 75 °C 69

รูปที่ 4.41: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิ 75 °C 70

รูปที่ 4.42: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิห้อง 71

รูปที่ 4.43: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิห้อง 72

รูปที่ 4.44: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิ 75 °C 73

รูปที่ 4.45: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 1.5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิ 75 °C 74

หน้า

หน้า

รูปที่ 4.46:ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 2% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง (E0) ณ อุณหภูมิห้อง 75

รูปที่ 4.47: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 2% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิห้อง 76

รูปที่ 4.48:ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 2% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิ 75 °C 77

รูปที่ 4.49: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 2% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิ 75 °C 78

รูปที่ 4.50: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิห้อง 79

รูปที่ 4.51:ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิห้อง 80

รูปที่ 4.52: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง (E0) ณ อุณหภูมิห้อง 81

รูปที่ 4.53: ประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 5% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิ 75 °C 82

รูปที่4.54: กราฟแสดงประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 10% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิห้อง 83

รูปที่ 4.55: แสดงประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 10% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ อุณหภูมิห้อง 84

รูปที่ 4.56: แสดงประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 10% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิ 75 °C 85

รูปที่ 4.57: แสดงประสิทธภาพของการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween80 ที่ความเข้มข้น 10% ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ในเวลาที่ในเวลา 24 ชั่วโมง (E24) ณ 75 °C 86

รูปที่ 4.58: ประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween 80 ที่ความเข้มข้น ความเข้มข้นต่างๆ ต่อ vegetable oils เปรียบเทียบการเตรียมที่อุณหภูมิ ห้อง (A) และที่ 75 °C (B) 87

รูปที่ 4.59: ประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, SLS และ Tween 80 ที่ความเข้มข้น ความเข้มข้นต่างๆ ต่อ hydrocarbon oils เปรียบเทียบการเตรียมที่อุณหภูมิ ห้อง (A) และที่ 75 °C (B) 88

รูปที่ 4.60: ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Agar cup ต่อเชื้อแบคทีเรีย 90