Thesis Title Production and Characterization of Rhamnolipid Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* SCMU106

Author Mr. Surachai Techaoei

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacy)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Pimporn Leelapornpisid	Advisor
Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Co-advisor
Prof. Dr. Frank M. Unger	Co-advisor
Prof. Dr. Helmut Viernstein	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Dammrong Santiarworn	Co-advisor
Dr. Wai Prathumpai	Co-advisor

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Abstract

One hundred and ninety-seven strains of bacteria were isolated from northern Thailand (69 from hot springs and 128 from garage sites) and screened for biosurfactant production. Their surfactant activities were detected by oil displacement area measurement, emulsification test and droplet formation on parafilm surface. Twenty-five strains of bacteria from garage sites showed a high biosurfactant

producing capability. Strain SCMU 106 which produced the biosurfactant with the highest values of oil displacement area (143.20 cm^2), emulsification index (60%), and droplet formation on parafilm surface (8.0 mm) was identified to be *Pseudomonas aeruginosa* by 16S rDNA sequence analysis. The combination of 1% glucose plus 0.1% corn oil as carbon source and 0.5% $NH_4H_2PO_4$ as nitrogen source was the initial optimal biosurfactant producing condition. Various parameters (the amount of glucose, corn oil, $NH_4H_2PO_4$ as well as different pH and temperature) were used for the optimization of biosurfactant produced from *P. aeruginosa* SCMU106. Statistically, ANOVA was used to improve the experimental efficiency. Finally, the optimal condition was obtained as followed: glucose (3.0 g/l) and 1% corn oil supplemented with $NH_4H_2PO_4$ (0.3 g/l), pH 8.0 at 37 °C with 500 rpm agitation in a 5-L bioreactorat, gave the highest yield at 0.014 g/ml. The effects of pH, salinity and temperature on the produced biosurfactant were also evaluated. The produced biosurfactant shown to be stable to high temperature, wide pH range (pH 6-10) and high salinity (NaCl solution up to 8% NaCl). The biosurfactant showed about 60% emulsification activity with various hydrocarbons and vegetable oils. Moreover, it showed wetting, foaming and detergency properties. Based on partial purification and chemical analysis of the biosurfactant, it was identified to be in glycolipid group as rhamnolipid. The purified glycolipid from *P. aeruginosa* SCMU106 was further submitted to spectroscopy analysis and identified to be dirhamnolipid (Rha-Rha-C10-C10). An aqueous solution of biosurfactant (5%) displayed antimicrobial activity against the pathogenic species (*Staphylococcus aureus*: MRSA, *S. aureus* ATCC25932 and β-hemolysis streptococcus group A) with MIC of 25.0, 50.0, and 0.39 mg/ml, respectively, but not against Gram-negative bacteria (*P. aeruginosa*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ATCC27853 and *Eschelichia coli* ATCC 25922). This will provide a new opportunity to apply rhamnolipid biosurfactant for the pharmaceutical and cosmetic fields.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตและการหาลักษณะเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนไลปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* SCMU 106

ผู้เขียน นายสุรชัย เตชะเอ้ย

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. พิมพร ลีลาพรพิสิฐ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ. ดร. สายสมร ลำยอง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. ดำรงณ์ ศานติอาวรณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. ไว ประทุมผาย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
Prof. Dr. Frank M. Unger	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
Prof. Dr. Helmut Viernstein	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจำนวน 197 ไอโซเลตที่แยกได้จากดินบริเวณพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย (69 ไอโอเลตจากบ่อน้ำพุร้อนและ 128 ไอโซเลตบริเวณอู่ซ่อมรถ) เพื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธีการแผ่กระจายบนผิวน้ำมัน การเกิดอิมัลชั่น และการแผ่กระจายบนพื้นผิวพาราฟิล์ม พบว่าแบคทีเรียจำนวน 25 ไอโซเลตที่แยกได้จากบริเวณอู่ซ่อมรถมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แบคทีเรียไอโซเลต SCMU106 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงที่สุดคือ สามารถแผ่กระจายบนผิวของน้ำมันเท่ากับ 143.20 ตารางเซนติเมตร การเกิดอิมัลชั่นเท่ากับ 60% และการแผ่กระจายบนพื้นผิว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พาราฟิล์มได้เท่ากับ 8.0 มิลลิเมตร จากการตรวจเอกลักษณ์ของสายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้วิธี 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวคือ *Pseudomonas aeruginosa* สภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส (1.0%) น้ำมันข้าวโพด (0.1%) เป็นแหล่งคาร์บอน และ $NH_4H_2PO_4$ (0.5%) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปัจจัยที่มีผลต่อสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *P. aeruginosa* SMU106 คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำมันข้าวโพด $NH_4H_2PO_4$ ความเป็นกรด -ด่าง และอุณหภูมิ การวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้โปรแกรมด้านสถิติได้ถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพต่อการทดลอง สภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือ น้ำตาลกลูโคส 3.0 กรัมต่อลิตร น้ำมันข้าวโพด (1.0%) $NH_4H_2PO_4$ 0.3 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด -เบสเท่ากับ 8.0 ที่อุณหภูมิ 37.0 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุดเท่ากับ 0.014 กรัมต่อมิลลิลิตร ผลกระทบของค่าความเป็นกรด -เบส เกลือและอุณหภูมิถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อศึกษาความมีเสถียรภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีภาพมีความเสถียรภาพต่ออุณหภูมิที่ระดับสูง ทนต่อความเป็นกรด -เบส ระหว่าง 6-10 และทนต่อค่าความเค็มของเกลือได้มากกว่า 8.0 เปอร์เซ็นต์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถเกิดอิมัลชั่นได้เท่ากับ 60% กับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและน้ำมันที่สกัดได้จากพืช นอกจากนี้ยังแสดงคุณสมบัติการเปียกน้ำ การเกิดโฟม การละลายและการชะล้าง จากฐานข้อมูลการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพขั้นต้นและคุณสมบัติทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าสารดังกล่าวคือกลุ่มไกลโคไลปิดชนิดแรมโนไลปิด เมื่อทำการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์จะให้ค่าอัตราการเคลื่อนที่ เท่ากับ 0.44 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค แมสเปกโตเมตรีพบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกบริสุทธิ์จากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* SCMU106 คือ ไดแรมโนไลปิด โดยมีสูตรโครงสร้างเป็น Rha-Rha-C10-C10 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ระดับ 5% สามารถต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคคือ *Staphylococcus aureus* (MRSA), *S. aureus* ATCC25932 และ β-hemolysis streptococcus group A โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้เท่ากับ 25.0, 50.0, และ 0.39 มิลกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบคือ *P. aeruginosa* ATCC27853 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนไลปิดจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะนำไปประยุกต์ใช้ด้านเวชศาสตร์เครื่องสำอาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved