**ชื่อภาษาไทย** การเพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นโดยการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีด้วยการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส

**ชื่อภาษาอังกฤษ** Modified Virgin Coconut Oils with Broad Antioxidant and Antimicrobial Spectrum by Application of Lipase

**ชื่อผู้วิจัย** นายฉัตรชัย สังข์ผุด หัวหน้าโครงการวิจัย

**ปีที่วิจัย** 2557-2558

## บทคัดย่อ

เอนไซม์ไลเปสเป็นอีกหนึ่งชนิดของเอนไซม์ที่มีการวิจัยพัฒนาและผลิตจำหน่ายกันเป็นทางการค้า เนื่องจากมีคุณสมบัติเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายกรดไขมัน สังเคราะห์เอสเทอร์ และแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์ จึงมีการนำมาใช้สำหรับการย่อยสลายหรือปรับเปลี่ยนโครงสร้างของน้ำมันและไขมันเพื่อให้มีคุณสมบัติต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และเภสัชกรรม เป็นต้น การดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันมะพร้าวโดยใช้เอนไซม์ไลเปสคาดว่าจะมีผลทำให้เพิ่มคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันได้ในวงกว้างขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของกรดไขมันอิสระสายกลาง และโมโนกลีเซอไรด์ของกรดไขมันสายกลาง เช่นโมโนลอริน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเอนไซม์ 6 แหล่ง คือ ไลเปส AY, M, F-AP15, PS, D และ Pancreatic lipase และควบคุมสภาวะที่เหมาะสมต่อการใช้เอนไซม์ไลเปสในการเพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยการดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันในระหว่างขั้นตอนการหมักสกัด นำน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมาทดสอบคุณภาพและการเปลี่ยนคุณภาพในระหว่างเก็บรักษา ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิว พร้อมทดสอบคุณสมบัติและความพึงพอใจของผู้ใช้ ผลการวิจัย พบว่า ผลการใช้เอนไซม์ไลเปส D เป็นตัวเร่งการดัดแปลงโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันก่อนหมักแยกสามารถให้ปริมาณผลผลิตน้ำมันมะพร้าวดัดแปลง ค่ากรด คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH radical scavenging capacity assay และสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์ *S. aureus* และ *E. coli* เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion method สูงสุด และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับผลการใช้เอนไซม์ไลเปสชนิดอื่น ๆ

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคือขูดเนื้อมะพร้าวระยะสุกห้าวมาคั้นด้วยความดัน 40 ปอนด์/ตารางนิ้ว นำน้ำกะทิที่ได้ผสมกับน้ำ 1 1 ปั่นผสม 1,500 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที แล้วแช่เย็นที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง แยกเอาเฉพาะครีมมาใส่ขวดโหลเติมกลีเซอรอล 25 มก./ ก.ก.เติมเอนไซม์ไลเปส D เตรียมในสารละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอช 6.0 เข้มข้น

10 มก./มล. จำนวน 10 มิลลิลิตรกวนผสม 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที หมักในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเกิดการแยกชั้นของน้ำมันที่สมบูรณ์ ตักส่วนน้ำมันมากรองด้วยกระดาษทิชชูแล้วอังในอ่างน้ำร้อน เวลา 1 ชั่วโมง บรรจุขวดไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้วปิดฝา พบว่า จะได้น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงสีขาวนวล มีกลิ่นฉุน และมีความหนืดที่สูงกว่าน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ โดยได้ปริมาณผลผลิตของเท่ากับ 30-33% ของครีม มีค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก 44% และค่ากรด 122

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH assay พบว่า น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมีค่า $IC_{50}$ สูงกว่าน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 2 เท่า คือ 47-67 และ 106.31 mg/ml ตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกับเชื้อด้วยวิธี disk diffusion method พบว่า น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างความเข้มข้น 6.25% มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* เทียบเท่ากับฟีนอล 15% คือสูงกว่าประมาณ 2 เท่า น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระในรูปกรดลอริก (%FFA) สูงมากเท่ากับ 44% แต่มีค่าความชื้น ค่าซาพอนิฟิเคชัน ค่าเพอร์ออกไซด์ อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ มผช. 670/2547 และมาตรฐาน อย. ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 57 (พ.ศ. 2524) โดยมีความชื้น 0.16% ค่าซาพอนิฟิเคชัน 249 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อน้ำมัน 1 กรัม ค่าเพอร์ออกไซด์ 3.74-4.43 มิลลิกรัมสมมูลเพอร์ออกไซด์ออกซิเจนต่อกิโลกรัมน้ำมัน เมื่อนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิว พบว่า ผลิตภัณฑ์มีสีขาวนวล พีเอช 3.91-4.22 เนื้อเจลมีลักษณะข้นเนียน มีฟองอากาศน้อย และไม่เหนียวเหนอะ มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้กรดซาลิซิลิก และอาสาสมัครมีความพึงพอใจต่อลักษณะปรากฏและคุณสมบัติต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ในภาพรวมระดับปานกลางถึงมาก ยกเว้นด้านกลิ่นที่ด้อยกว่าผลการใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

**คำสำคัญ:** เอนไซม์ไลเปส น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น การต้านอนุมูลอิสระ การต้านเชื้อจุลินทรีย์

**Research Title** Modified Virgin Coconut Oils with Broad Antioxidant and Antimicrobial Spectrum by Application of Lipase

**Researcher** Mr. Chatchai Sungpud

**Organization** Nakhon Si Thammarat Rajabhat University

**Years** 2014-2015

# ABSTRACT

Lipase is an enzyme that kind of research, development and manufacturing as well as trade. Due to qualify catalytic hydrolysis, ester synthesis and transesterification reaction. It has been used for decomposition or modification of the structure of the oil and fat. In order to have different properties that are suitable for use in pharmaceutical, cosmetic and food industries. The modified structure of coconut oil using lipase is expected to result in enhanced antimicrobial properties and antioxidants, have a wider range of oil. This is the result of the work of medium chain fatty acids (MCFA). And mono-glycerides of medium chain fatty acids such as monolaurin.

This research aims to screening enzyme 6 sources lipase AY, M, F-AP15, PS, D and Pancreatic lipase and optimized conditions to enhance the properties of antioxidants and antimicrobial by altering the structure of the oil extracted in the process of fermentation. Modified coconut oil is used to test the quality and the quality during storage. Acne gel product is produced. And testing of the product and satisfaction of users. The results showed that the use of lipase catalyst D is a modification of the triglyceride oil extracted before fermentation. Oil yield, acid value, antioxidant properties by DPPH radical scavenging capacity assay and antimicrobial properties of *S. aureus* and *E. coli* when tested by disc diffusion method and a maximum difference was statistically significant ($P<0.05$) with the use of other kinds of lipase.

Optimization of production is at a mature stage dashing crushed coconut meat. Then squeeze the pressure of 40 lbs/inch$^2$. Bring the milk to be mixed with water 1: 1 stirring 1500 rpm for 15 minutes and then frozen at -18 °C for 2 hours, remove the cream filled in jar containing long round shape. Adding glycerol 25 mg/kg, lipase D prepared in a solution 1.0 M phosphate buffer, pH 6.0 concentration 10 mg/ml, 10 ml, stirring 1500 rpm at 30-35 °C for 30 minutes, and incubated at 35 °C for 24 hours to achieve complete separation of oil. Loading separating the oil layer. Purified by filtration with a tissue. Removal of water with a soak in the hot tub at 1 hour after bottling the air with nitrogen, then cover. Modified coconut oil has been found to be white

with a pungent odor and a viscosity greater than virgin coconut oil The yield of 30-33% of the value of cream, %FFA in the form of lauric acid is 44% and acid value is 122.

Test the antioxidant activity in DPPH assay showed that the modified coconut oil, virgin coconut oil with $IC_{50}$ values higher than two times 47-67 and 106.31 mg/ml, respectively inhibition test against infection by disk diffusion method, found that the modified coconut oil has a concentration of 6 25% inhibition of *S. aureus* and *E. coli*, equivalent to 15% of phenol was approximately two times higher. Modified coconut oil is the percentage of free fatty acids in lauric acid (%FFA) is very high as 44%, but moisture content, saponification value, peroxide value and anisidine value were 0 16%, 249 mg KOH/g oil and 3.74-4.43 meq/kg respectively, which are better than the product standards of Thai Industrial Standards Institute, OTOP standard 670/2004 and Thai Food and Drug Administration, notification No. 57 (1981). When used to produce a gel acne products that are white gel, pH 3 91- 4.22, gel is thick and smooth A few bubbles and not sticky. Gel is effective in inhibiting *S aureus* bacteria without the need to use salicylic acid group. And volunteers were satisfied with the appearance and features of the product include moderate to high levels. Except for the smell worse than the result of virgin coconut oil.

**Keywords:** Lipase, Virgin Coconut Oil, Antioxidant, Antimicrobial