ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การใช้ไลเปสตรึงในการเพิ่มกรดไอโคซะเพนทาอิโนอิค(อีพีเอ) และกรดโดโคซะเฮกซะอิโนอิค(ดีเอชเอ) จากน้ำมันปลา
ชื่อผู้เขียน	นางสาวปิโยรส หงษาชาติ
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล	ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ สาระเวก	กรรมการ
อาจารย์ ดร.ดารารัตน์ ทองขาว	กรรมการ

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาหาปริมาณ EPA(eicosapentaenoic acid) และ DHA (docosahexaenoic acid) ในน้ำมันจากปลาชนิดต่างๆต่อไปนี้ ปลากะพง(*Lutjanus argentimaculatus* Forskal) ปลาแดงลี ปลาเมนฮาเดน(*Brevoortia* sp.) ปลาทูน่า(*Thunnus* spp.) ซึ่งสกัดจาก 3 ส่วนคือ เบ้าตาปลา การบีบอัดจากหัวปลานึ่งสุก และได้จากน้ำนึ่งปลา และปลาน้ำจืด 1 ชนิดคือ ปลาดุก (*Clarias* spp.) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยโครมาโทกราฟีก๊าซพบว่า น้ำมันปลาทูน่าจากเบ้าตาปลาทูน่ามี DHA สูงสุด 59.75 มก./มล. รองลงมาเป็นน้ำมันที่ได้จากการบีบอัด 53.60 มก./มล. ส่วน EPA พบมากที่สุดในน้ำมันเมนฮาเดน(25.49 มก./มล.) รองลงมาเป็นน้ำมันปลาทูน่าจากการบีบอัด (14.40 มก./มล.) เมื่อพิจารณาความเหมาะสมได้เลือกน้ำมันปลาทูน่าที่ได้จากการบีบอัดเป็นสารตั้งต้นในการเตรียม DHA และ EPA เข้มข้นโดยใช้ไลเปสตรึง

ได้ทำการศึกษาไลเปสทนความร้อนที่ผ่านการโคลนแล้ว 2 ชนิดคือ pQE-TP811 และ pQE-P1 ที่ได้มาจาก *Bacillus stearothermophilus* TP811 และ P1 ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการหาแอคติวิตีของไลเปสทั้งสองชนิดโดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenyl laurate พบว่าไลเปสจาก pQE-TP811 มี specific activity สูงกว่าไลเปสจาก pQE-P1 เล็กน้อย ส่วนการศึกษาจลนศาสตร์ของไลเปส โดยใช้น้ำมันมะกอกและน้ำมันปลาที่ผ่าน

การคัดเลือกเป็นสับสเตรทได้ค่า Km ของไลเปสจาก pQE-TP811 เป็น 7.63 และ 17.90 มิลลิโมลาร์ ส่วนไลเปสจาก pQE-P1 ให้ค่า 34.60 และ 42.85 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และค่า Vmax ของไลเปสจาก pQE-TP811 เท่ากับ 1.29 และ 1.11 ยูนิต/มล. ส่วนของไลเปสจาก pQE-P1 มีค่า 1.42 และ 4.50 ยูนิต/มล. ตามลำดับจากข้อมูลข้างต้นชี้ให้เห็นว่าไลเปสจาก pQE-TP811 ไฮโดรไลส์น้ำมันมะกอกและน้ำมันปลาได้ดีกว่าไลเปสจาก pQE-P1 จากนั้นได้ทำการตรึงไลเปสทนความร้อนทั้งสองบน celite 545 และทำการหาแอคติวิตีของไลเปสพบว่าเมื่อตรึงแล้วไลเปสทั้งสองมีแอคติวิตีลดลง 10% และ 17% ตามลำดับ แต่ความสามารถในการไฮโดรไลส์น้ำมันของไลเปสทั้งสองตัวเพิ่มขึ้น ส่วนไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 มีความสามารถในการย่อยน้ำมันปลาได้ดีกว่าน้ำมันมะกอกเมื่อเปรียบเทียบกับไลเปสในรูปอิสระ นอกจากนี้ได้มีการศึกษาปฏิกิริยาเอทานอไลซีสน้ำมันปลาของไลเปสทนความร้อนทั้งสองเทียบกับไลเปสทางการค้าที่มีความสามารถในการตัดกรดไขมันบนไตรกลีเซอไรด์ที่ตำแหน่งต่างๆกัน ดังนี้ Lipase A มีความสามารถในการตัดตำแหน่งที่ 2 ไลเปสจาก *Mucor miehei* ตัดตำแหน่งที่ 1 และ 3 และ ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* PS มีความสามารถในการตัดไม่จำเพาะ โดยนำไลเปสทั้งหมดมาตรึงบน celite 545 และทำปฏิกิริยาเอทานอไลซีส จากผลการวิเคราะห์การทำปฏิกิริยาของไลเปสจาก *P. fluorescens* PS ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ของ DHA สูงสุด 0.39 มก./มล. รองลงมาได้จากไลเปสตรึง pQE-TP811 (0.30 มก./มล.) ส่วนไลเปสตรึงจาก lipase A และ ไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ของ EPA สูงใกล้เคียงกันคือ 0.0805 และ0.1005 มก./มล. ตามลำดับ และไลเปสจาก *P. fluorescens* PS ได้ปริมาณรองลงมา เมื่อพิจารณาสัดส่วนของ ethyl oleate: ethyl linoleate : ethyl EPA : ethyl DHA ของน้ำมันปลาที่ผ่านการไฮโดรไลส์อย่างสมบูรณ์ด้วยวิธีทางเคมี เปรียบเทียบกับการไฮโดรไลส์ที่โดยไลเปสตรึงพบว่า lipase A ตรึง ให้สัดส่วนของ เอทิล EPA และเอทิล DHA สูงสุด โดยสัดส่วนที่ได้เป็นดังนี้ 1 :0 :42.0 :104.7 ส่วนไลเปสตรึงจาก *P. fluorescens* PS และ ไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 มีสัดส่วนใกล้เคียงกันยกเว้นสัดส่วนของเอทิล EPA ที่ได้จาก pQE-TP811 มีสัดส่วนที่สูงกว่าไลเปสตรึงจาก *P. fluorescens* PS ประมาณ 2.3 เท่า ดังนั้นไลเปสจาก pQE-TP811 มีแนวโน้มที่ชอบ กรดไขมันสายยาวที่ไม่อิ่มตัวซึ่งเหมาะสำหรับใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของ EPA และ DHA ในน้ำมันปลา ส่วนอายุการใช้งานไลเปสตรึงในรอบแรกแอคติวิตีของไลเปสตรึงสูงและค่อยๆลดลงในรอบต่อมาและเมื่อเติมน้ำในรอบที่ 6 แอคติวิตีของไลเปสตรึงไม่ดีขึ้น ส่วนช่วงเวลาที่ใช้เร่งปฏิกิริยาให้ได้ผลผลิต DHA และ EPA สูงใน 1 รอบ นั้นมีแนวโน้มที่จะใช้เวลามากกว่า 60 ชั่วโมงขึ้นไป

Thesis Title	Use of Immobilized Lipase on the Enrichment of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA) from Fish Oil
Author	Miss Piyorot Hongsachart
M.S.	Biotechnology
Examining Committee	
	Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul Chairman
	Asst. Prof. Dr. Sirirat Sarawek Member
	Dr. Dararat Tongkao Member

Abstract

The content of EPA(Eicosapentaenoic acid) and DHA (Docosahexaenoic acid) in fish oil from red snapper(*Lutjanus argentimaculatus* Forskal), Danglee, menhaden (*Brevoortia* sp.), tuna(*Thunnus* spp) oil from tuna condensate, cooked tuna head pressing , tuna eye socket oil and catfish(*Clarias* spp.) oil were determined by gas chromatography. The highest content of DHA found in tuna eye socket oil was about 59.45 mg/ml followed by the content in tuna oil from cooked tuna head pressing was about 53.60 mg/ml, whereas the high content of EPA found in the menhaden oil was about 25.49 mg/ml followed by the content in cooked tuna head pressing was about 14.40 mg/ml. In this study we chose tuna oil from cooked tuna head pressing for the enrichment of DHA and EPA in fish oil by immobilized lipase dued to high content of both DHA and EPA and the amount of oil which could be obtained from the fish.

The lipase from the cloned pQE-TP811 and pQE-P1 carrying thermostable lipase gene from *Bacillus stearothermophilus* TP811 and P1 isolated from hot spring in Chiang Mai were studied. The hydrolytic activity of these lipases on p-nitrophenyl laurate found that the specific activity of pQE-TP811 lipase was higher than pQE-P1 lipase. The kinetic study of the lipases using olive and tuna oil as substrates gave the apparent Km for pQE-TP811 lipase were 7.63 and 17.90 mM whereas Km of pQE-P1 lipase were

34.60 and 42.85 mM, respectively. The Vmax values of pQE-TP811 were 1.29 and 1.11 U/ml while those for the pQE-P1 lipase were 1.42 and 4.50 U/ml, respectively. This result indicated that the pQE-TP811 had hydrolytic activity on olive and tuna oil higher than pQE-P1 lipase. The activity of both lipases immobilized on celite 545 were decreased about 10% and 17% respectively but the hydrolytic activity on both oils were increased. The immobilized pQE-TP811 lipase had hydrolytic activity on tuna oil higher than olive oil when compared with free enzyme. The ethanolysis of tuna oil by both thermostable immobilized lipase were studied in comparision with commercial lipases from recombinant *Candida antarctica*(lipase A) *Pseudomonas fluorescens* PS, and *Mucor miehei* were immobilized on celite 545. The highest yield of ethyl DHA from the alcoholysis was obtained using immobilized *P. fluorescens* lipase(0.39 mg/ml) followed by immobilized pQE-TP811 lipase (0.30 mg/ml). The reaction using immobilized lipases from lipase A and pQE-TP811 gave ethyl EPA 0.0805 and 0.1005 mg/ml, respectively followed by immobilized *P. fluorescens* PS lipase. The complete hydrolysis of tuna oil by chemical reaction gave amount ratio of the ethyl oleate: ethyl linoleate : ethyl EPA : ethyl DHA ratio compare with the ethanolysis catalyzed by the immobilized lipases. The lipase A which had high 2-positional specificity in hydrolysis of triglycerides gave highest ratio of ethyl EPA and ethyl DHA were 1:0:35.0:104.7. The ratios of ethanolysis product catalyzed by immobilized lipases from *P. fluorescens* PS and pQE-TP811 were the same except the ethyl EPA ratio that higher than yielding from immobilized *P. fluorescens* PS lipase about 2.3 times. The results indicated that pQE-TP811 lipase had high specificity to long chain polyunsaturated fatty acid that suitable for the enrichment of EPA and DHA from fish oil. The operational stability of the immobilized pQE-TP811 and immobilized *P. fluorescens* PS lipase were also studied and found that the activity of the immobilized enzymes were heighest at first cycle of the operation and gradually decreased until the fifth cycle. Addition of water into the system in the sixth cycle did not improve the yield. The operation time of the ethanolysis to give high yield was more than 60 hours.