ชื่อวิทยานิพนธ์ การสังเคราะห์น้ำมันปลาที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงโดยใช้เอนไซม์
ผู้เขียน นายรัชพล พะวงศ์รัตน์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2549

บทคัดย่อ

การศึกษากระบวนการสังเคราะห์น้ำมันปลาที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงโดยใช้กระบวนการทางเอนไซม์ 2 ขั้นตอน ประกอบด้วย การไฮโดรไลซิสของน้ำมันจากปลาทูน่า และการเอสเทอร์ริฟิเคชั่นแบบจำเพาะเจาะจงทำให้ได้กรดไขมันอิสระ (FFA) ที่มีกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง(PUFA) โดยเฉพาะ กรดอีพีเอ (eicosapentaenoic acid; EPA) และกรดดีเอชเอ (docosahexaenoic acid; DHA) น้ำมันจากปลาทูน่าที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วยกรดอีพีเอ และกรดดีเอชเอ ปริมาณร้อยละ 6.42 และ 28.18 ตามลำดับ เมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 3 ชนิด (Lipase PS จาก *Pseudomonas* sp.; Lipase AK จาก *Psuedomonas fluorescence* และ Lipase D จาก *Rhizopus delema*) พบว่า การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป D และ PS ให้ปริมาณกรดไขมันอิสระสูงเกินร้อยละ 80 แต่เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป D (100 ยูนิต/กรัมส่วนผสม ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ให้กรดอีพีเอ และกรดดีเอชเอสูงสุด (คิดเป็นร้อยละ 8.31 และ 34.74 ตามลำดับ ในส่วนของกรดไขมันอิสระ) (เปรียบเทียบกับไตรกลีเซอไรด์เริ่มต้น) กรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปลาทูน่าจะถูกแยกด้วยกระบวนการ saponification และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และนำไปทำให้มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงด้วยกระบวนการเอสเทอร์ริฟิเคชั่นแบบจำเพาะ โดยกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปลาทูน่า กับแอลกอฮอล์สายโซ่ตรง (ออคทานอล; C 8:0) โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป พบว่า เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป AK (100 ยูนิต/กรัมส่วนผสม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) สามารถเปลี่ยนกรดไขมันอิ่มตัวให้อยู่ในรูปเอสเทอร์และได้ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ร้อยละ 63.8 โดยมีกรดอีพีเอ ร้อยละ 10.31 และกรดดีเอชเอ ร้อยละ 50.74 ในส่วนของกรดไขมันอิสระ และการแยกกรดไขมันที่อิ่มตัวและกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเล็กน้อยจากกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปลาทูน่าโดยใช้กระบวนการตกตะกอนโดยยูเรีย (Urea Complexation) ในสารละลายเอธานอล (ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณผลผลิตของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงเพิ่มขึ้น ร้อยละ 50.4 โดยมีกรดอีพีเอ และกรดดีเอชเอ ร้อยละ 19.50 และ 56.21 ตามลำดับ

การศึกษาการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล (MAG) ที่เพิ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง โดยเฉพาะกรดอีพีเอ และกรดดีเอชเอ ด้วยกระบวนการกลีเซอโรไลซิส (glycerolysis) ของน้ำมันจากปลาทูน่าในสารละลายอินทรีย์ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป AK บน แอคคูเรล EP-100 พบว่า การใช้เมททิลบิวทิลอีเทอร์ (MTBE) เป็นตัวทำละลาย มีความเหมาะสมที่สุด และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต MAG คือ น้ำมันจากปลาทูน่าร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ใน MTBE อัตราส่วนโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันจากปลาทูน่า เท่ากับ 3.0:1.0 เติมน้ำร้อยละ 4 โดยน้ำหนักในกลีเซอรอล และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป AK ร้อยละ 30 โดยน้ำหนักของน้ำมันปลาทูน่า ทำปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ได้ปริมาณผลผลิตของ MAG ร้อยละ 24.6 โดยประกอบด้วยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง ร้อยละ 56 (กรดอีพีเอ และกรดดีเอชเอ) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป AK ด้วย พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือมีค่า เท่ากับร้อยละ 88 และ 80 ของกิจกรรมเริ่มต้นหลังจากบ่มในสารละลาย MTBE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยค่า K_m และ V_{max} เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป AK ในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซิสน้ำมันจากปลาทูน่าใน MTBE มีค่าเท่ากับ 19.47 และ 2.71 มิลลิโมลลาร์/นาที ตามลำดับ

จากการศึกษาการพัฒนาประสิทธิภาพของเอนไซม์ในปฏิกริยากลีเซอโรไลซิส และกระบวนการแยกทางกายภาพ เพื่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่มีกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอีพีเอและกรดดีเอชเอจากน้ำมันปลาทูน่าโดย เอนไซม์ Novozym 435 ในระบบที่มีเทอเธียริลบิวทานอล (TB) เป็นตัวทำละลายนั้น สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต MAG คือ อัตราส่วนโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันจากปลาทูน่า มีค่าเท่ากับ 4.0:1.0 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของ TB ต่อน้ำมันจากปลาทูน่า มีค่าเท่ากับ 2.0:1.0 เอนไซม์ Novozym 435 มีค่าเท่ากับร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก (ของกลีเซอรอลและน้ำมันจากปลาทูน่า) และไม่มีการเติมน้ำในปฏิกิริยา โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนี้ทำให้ได้ปริมาณของ MAG มากถึง ร้อยละ 90 หลังจากดำเนินปฏิกิริยานาน 3 ชั่วโมง การศึกษาหาสภาวะการแยก MAG ที่ได้ด้วยตัวทำละลายอะซิโตนและเฮกเซนในอัตราส่วนต่างๆกัน เพื่อแยก MAG ที่มีกรดอีพีเอและกรดดีเอชเอในปริมาณสูง พบว่า การใช้ตัวทำละลายอะซิโตนที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ได้ปริมาณผลผลิตของ MAG ร้อยละ 50 ซึ่งประกอบด้วยกรดอีพีเอและกรดดีเอชเอรวม ร้อยละ 71 เทียบกับน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้นซึ่งมีประมาณ ร้อยละ 30

จากการศึกษาการผลิตไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) ที่มีกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง โดยใช้ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ริฟิเคชั่นด้วยเอนไซม์ไลเปสระหว่างน้ำมันปลาที่อยู่ในรูปของเอทิลเอสเทอร์ (FOEE) กับ ไตรอะซิติน (TA) ไตรบิวทิวลิน (TB) กลีเซอรอล (Gly) และ MAG โดย

ได้เลือกเอนไซม์ Lipozyme TL IM ในการศึกษาและการศึกษาขั้นตอนการเติมของสับสเตรทอีกด้วย พบว่า MAG เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ริฟิเคชั่นกับเอนไซม์ Lipozyme TL IM และใช้ขั้นตอนการเติมสับสเตรทแบบ 3 ขั้นตอน จากการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ริฟิเคชั่นโดยใช้วิธี Response Surface Methodology ซึ่งปัจจัยที่ใช้ในการพิจารณาประกอบด้วย 4 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ คือ อุณหภูมิ (T_e, องศาเซลเซียส), ความเป็นสุญญากาศ (V_c, มิลลิบาร์), อัตราส่วนของสับสเตรท (S_r, FOEE/แอลกอฮอล์, โมล/โมล) และเวลาในการทำปฏิกริยา (T_i, ชั่วโมง) พบว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลเรียงตามลำดับ คือ $S_r > V_c > T_e > T_i$ โดยโมเดลสมการที่เหมาะสมได้ถูกสร้างขึ้น และจากโมเดลสมการดังกล่าว พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต TAG ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงโดยปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ริฟิเคชั่นระหว่าง FOEE และ MAG คือ S_r มีค่าเท่ากับ 6.0/1.0 โมล/โมล, V_c มีค่าเท่ากับ 0.2 มิลลิบาร์, T_e มีค่าเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส และ T_i มีค่าเท่ากับ 15 ชั่วโมง พบว่า ในสภาวะนี้จะได้ไตรเอซิลกลีเซอรอล ร้อยละ 90.2

Thesis Title Enzymatic Synthesis of Polyunsaturated Fatty Acids Rich Fish Oil

Author Mr. Ratchapol Pawongrat

Major Program Biotechnology

Academic Year 2006

ABSTRACT

Synthesis of polyunsaturated fatty acid-rich fish oil by a two-step enzymatic method that consisted of hydrolysis of tuna oil and selective esterification of resulting free fatty acids (FFA) to enrich the polyunsaturated fatty acid (PUFA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) was studied. Tuna oil used in this study contained EPA and DHA 6.42 and 28.18%, respectively. Three kinds of immobilized lipases (Lipase PS from *Pseudomonas* sp.*;* Lipase AK from *Psuedomonas fluorescence* and Lipase D from *Rhizopus delema*) were used. The results showed that immobilized Lipase D and Lipase PS provided the highest content of FFA above 80 wt% but immobilized lipase D (100 U/g mixture, 40 ^{O}C for 24 h) gave the highest degree of EPA and DHA (8.31 and 34.74% in free fatty acids mixture). The FFA mixture was separated by saponification and solvent extraction and was further enriched in PUFA by selective esterification of hydrolyzed FFA mixture with linear chain alcohol (octanol; C 8:0) by these immobilized lipases. The immobilized lipase AK (100 U/g mixture, 50 ^{O}C for 24 h.) could esterified saturated fatty acids with octanol with the good enrichment of PUFA (10.31% EPA and 50.74% DHA in free fatty acids mixture) with yield of 63.8 wt%. Separation of saturated and less unsaturated free fatty acid from FFA mixture by urea complexation in an ethanolic solution (20 wt%, urea at 4 ^{O}C) showed that yield of PUFA increased with high contents of EPA and DHA of 19.50 and 56.21%, respectively with yield of 50.4 wt%.

Production of monoacylglycerols (MAG) rich in PUFA, especially EPA and DHA, by glycerolysis of tuna oil with Lipase AK immobilized on Accurel EP-100 (IM-AK) was studied. *tert*-Butyl methyl ether (MTBE) was the most suitable organic solvent after screening a list of different solvents and their mixtures. The optimum condition for MAG production was found to be 10 %w/v of tuna oil in MTBE, the mole ratio of glycerol to tuna oil 3.0:1.0, water added 4 wt% in glycerol, and the amount of IM-AK 30 wt% based on tuna oil. The temperature

was controlled at 45°C. Under these conditions with 24 h reaction, the yield of MAG was 24.6% but containing 56.0 wt% PUFA (EPA and DHA). Stability of the IM-AK was also studied. The hydrolytic activity of the enzyme remained 88 and 80% of an initial activity after incubated in MTBE for 24 h at 4 and 45°C, respectively. The K_m and V_{max} values of the lipase-catalyzed glycerolysis of tuna oil in MTBE were 19.47 and 2.71 mM/min, respectively, for IM-AK.

The development of an efficient enzymatic glycerolysis system together with physical fractionation operation for the production of MAG containing PUFA, especially, EPA and DHA from tuna oil was studied. Novozym 435 was employed as a catalyst in glycerolysis following enzyme screening. Basic reaction parameters were thoroughly studied. In the batch reaction system with *tert*-butanol (TB) as a solvent, the following conditions for MAG production was recommended as: mole ratio of glycerol to tuna oil 4.0:1.0, the weight ratio of TB to tuna oil 2.0:1.0, 15 wt% Novozym 435 (based on glycerol and tuna oil), and no additional water. The temperature was controlled at 40°C. Under these conditions, the yield of MAG was up to 90% after 3 h incubation. Crude MAG from glycerolysis of fish oil was fractionated with acetone and hexane to produce MAG with higher EPA and DHA content. Using acetone at 0°C was the suitable condition for the fractionation. Under these conditions, the yield of MAG was about 50% but contained EPA and DHA up to 71% in comparison with around 30% in tuna oil.

Triacylglycerols (TAG) rich in PUFA were produced by lipase-catalyzed interesterification between fish oil ethyl ester (FOEE) and different alcohol moieties. For this purpose two commercially available immobilized lipases were examined and Lipozyme TL IM was finally selected for further experiments. Four different kinds of alcohol moieties, including triacetin (TA), tributyrin (TB), glycerol (Gly) and MAG were interesterified with FOEE and the stepwise addition of substrates was also studied. It was found that MAG was suitable for interesterification with Lipozyme TL IM by three steps of addition. Lipozyme TL IM-catalyzed interesterification in solvent-free system was optimized using Response Surface Methodology. A three-level four-factor fraction factorials design with star point was adopted. The four factors chosen were reaction temperature (T_e, °C), vacuum (V_c, mbar), substrate ratio (S_r, FOEE/alcohol moiety, mol/mol) and reaction time (T_i, h). Interesterification was influenced by these factors in the following order: $S_r > V_c > T_e > T_i$. The best fitting quadratic model was determined by regression and backward elimination. Based on the fitted model, the optimal reaction conditions

for the production of TAG riched PUFA by Lipozyme TL IM-catalyzed interesterification between FOEE and MAG were S_r, 6.0/1.0 mol/mol, V_c, 0.2 mbar, T_e, 70°C and T_i, 15 h. At these experimental conditions, 90.2% TAG can be obtained.