

การเพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ω -3 ในน้ำมันปลาทูน่า
โดยไลเปสตรึงรูป

Enrichment of the ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids in Tuna Oil
by Immobilized Lipases



อัญชลี สาระบอก

Anchalee Sarabok

๖

เลขที่ QP762.F35 062 2544 ฌ.2
Bib Key... 212913
20 ค.พ. 2544

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2544

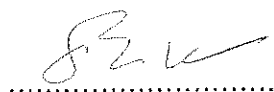
ชื่อวิทยานิพนธ์ การเพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ω -3 ในน้ำมันปลาทูน่าโดย
ไลเปสตรังรูป

ผู้เขียน นางสาวอัญชลี สาระไบก

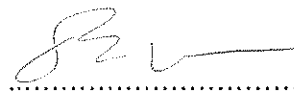
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

คณะกรรมการสอบ



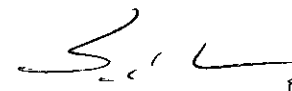
.....ประธานกรรมการ



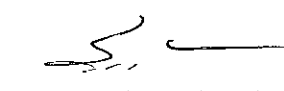
.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกุล)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกุล)



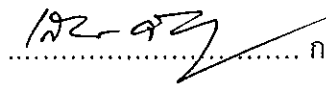
.....กรรมการ



.....กรรมการ

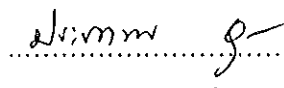
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทธีวัฒน์ เบญจกุล)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทธีวัฒน์ เบญจกุล)



.....กรรมการ

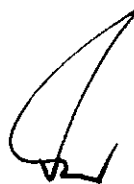
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล)



.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุฑารพินธุ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ



.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปิติ ทฤษฎิคุณ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ω -3 ในน้ำมันปลาทูน่าโดยไลเปสตรังรูป
ผู้เขียน	นางสาวอัญชลี สาระโบก
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2543

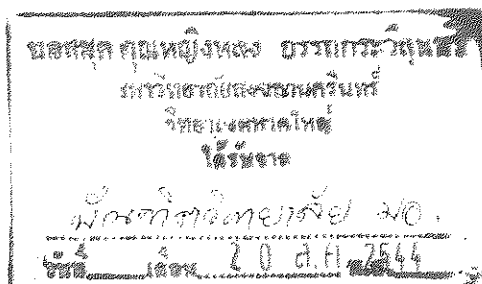
บทคัดย่อ

น้ำมันปลาทูน่ามีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่ม ω -3 (ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids, ω -3 PUFAs) โดยเฉพาะกรดอีพิเอ (Eicosapentaenoic acid, EPA) และกรดดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid, DHA) ในปริมาณสูง ซึ่ง EPA และ DHA มีประโยชน์ทั้งในด้านที่มีคุณค่าทางโภชนาการและการแพทย์ จึงมีการศึกษาเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าโดยการใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยา น้ำมันปลาทูน่าที่ใช้ในการทดลองนี้ได้จากการบีบอัดส่วนหัวของปลาทูน่าพันธุ์ Skipjack แล้วทำให้บริสุทธิ์ มีองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ร้อยละ 99.5 และมีปริมาณ EPA และ DHA เท่ากับร้อยละ 6.42 และ 27.18 ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ เอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ไลเปส PS (*Pseudomonas sp.*) และไลเปส D (*Rhizopus delemar*) ถูกดูดซับทางกายภาพบนแอสคูเรล มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึง เท่ากับ 0.94 และ 1.45 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรังรูป ตามลำดับ และ Lipozyme® IM มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 0.13 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรังรูป

การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปในการทดลองนี้ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ขั้นตอนที่ 1 คือ ใช้เอนไซม์ไลเปส PS ตรังรูปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่าเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ (FFA-PS) สภาวะที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา คือ น้ำมันปลาทูน่าและน้ำ 1.5:1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก (ปริมาณน้ำร้อยละ 40 ของน้ำหนักส่วนผสม) เอนไซม์ไลเปส PS ตรังรูป 30 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเกิด FFA-PS เท่ากับร้อยละ 79.95 โดยมีปริมาณ ω -3 PUFAs เท่ากับร้อยละ 36.58 ซึ่งคิดเป็น % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น เท่ากับร้อยละ 87.04 หลังจากนั้นใช้เอนไซม์ไลเปส D ตรังรูปเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่าง FFA-PS กับลอรอลแอลกอฮอล์ 1:3 โมลต่อโมล ปริมาณน้ำร้อยละ 20 ของน้ำหนักส่วนผสม เอนไซม์ไลเปส D ตรังรูป 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม ที่ 30 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS ให้สูงขึ้น (เรียกว่า FFA-D) พบว่าในส่วนของ FFA-D มีปริมาณ ω -3 PUFAs เท่ากับร้อยละ 64.45 ของกรดไขมันทั้งหมด ขั้นตอนที่ 2 เป็นการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่าเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ (MG-D) ด้วยเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูป โดยสภาวะที่เหมาะสม คือ น้ำมันปลาทูน่าและน้ำ 1:1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ละลายใน Methyl-tert-Buthyl-Ether 1:1 น้ำหนักต่อปริมาตร เอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูป 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเกิด MG-D เท่ากับร้อยละ 19.89 โดยมีปริมาณ ω -3 PUFAs เท่ากับร้อยละ 56.57 ซึ่งคิดเป็น % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น เท่ากับร้อยละ 33.49 และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ให้อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ โดยใช้ MG-D และ FFA-D (1:2 โมลต่อโมล) 100 มิลลิกรัม ในเฮกเซน 2 มิลลิลิตร เอนไซม์ตรึงรูป Lipozyme® IM ร้อยละ 10 ของน้ำหนักส่วนผสม ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตไตรกลีเซอไรด์ได้ร้อยละ 64.40 ซึ่งมีปริมาณ ω -3 PUFAs ร้อยละ 74.11 ของกรดไขมันทั้งหมด คิดเป็น % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของไตรกลีเซอไรด์ เท่ากับร้อยละ 47.73

เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาซ้ำโดยใช้ยูนิตต่อกรัมส่วนผสมเท่ากันในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง พบว่าเอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูปสามารถนำกลับมาใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เป็นครั้งที่ 4 คงเหลือกิจกรรมเท่ากับ 0.10 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป ส่วนเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปสามารถนำกลับมาใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D ได้ถึง 6 ครั้ง จึงจะทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงต่ำกว่าร้อยละ 50 ของกิจกรรมเริ่มต้น เท่ากับ 0.61 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป และเมื่อนำเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปกลับมาใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D สามารถใช้ได้ 6 ครั้งเช่นกัน โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือ 0.63 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป



Thesis Title Enrichment of the ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids in Tuna Oil
 by Immobilized Lipases
Author Miss Anchalee Sarabok
Major Program Biotechnology
Academic Year 2000

Abstract

Tuna oil is rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFAs), especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) which have high nutritional quality and medical applications. These benefits suggested enriching the ω -3 PUFAs in tuna oil catalysing by lipase. Crude tuna oil was pressed from Skipjack tuna head and refined. The refined tuna oil contained 99.5% triglyceride composing of 6.42% EPA and 27.18% DHA. This work tried to use immobilized lipases to enrich the ω -3 PUFAs in tuna oil by three-step process. Two lipases, Lipase PS (*Pseudomonas sp.*) and Lipase D (*Rhizopus delemar*) were immobilized by physical adsorption on Accurel EP-100 and had hydrolytic activity of 0.94 and 1.45 U/mg of immobilized enzyme, respectively. Lipozyme® IM was also used with the activity of 0.13 U/mg of immobilized enzyme.

First step, immobilized Lipase PS was used to enrich the ω -3 PUFAs in the free fatty acid fraction (FFA-PS) by selective hydrolysis of tuna oil. The optimal conditions for hydrolysis were determined. The mixture of tuna oil and water (1.5:1 w/w) and immobilized Lipase PS 30 U/g of the reaction mixture were mixed at 45 C for 24 h. After hydrolysis, the ω -3 PUFAs recovered in the FFA fraction was 87.04%. Selective esterification of FFA-PS was then conducted at 30 C for 18 h by stirring a mixture of FFA-PS and lauryl alcohol (1:3 mol/mol), 20% water and 100 U of the immobilized Lipase D/g of the reaction mixture. The result showed that the ω -3 PUFAs content in the unesterified FFA fraction (FFA-D) could be raised from 36.58 to 64.45%. Second step, enrichment of ω -3 PUFAs in monoglyceride fraction (MG-D) was carried out by selective hydrolysis of

tuna oil with immobilized Lipase D. The reaction proceeded most effectively when a mixture of tuna oil and water (1:1 w/w) in Methyl-*tert*-Butyl Ether (1:1 weight of the reaction mixture/volume of MTBE) was reacted with 100 U of immobilized Lipase D/g of the reaction mixture at 30 C for 18 h. Under these conditions, 33.49% ω -3 PUFAs was recovered in this fraction. In the last step, selective esterification of FFA-PS with MG-D for production of triglyceride rich in ω -3 PUFAs was conducted by Lipozyme® IM. A mixture of 100 g FFA-D and MG-D (1:2 mol/mol) was dissolved in 2 ml hexane and reacted with 10% Lipozyme® IM at 55 C for 24 h. Triglyceride was produced to 64.40% and contained 74.11% ω -3 PUFAs. Furthermore, the reuse of each immobilized lipase for catalytic reactions was determined. Immobilized Lipase PS was used repeatedly 4 times with the activity of 0.10 U/mg after the fourth use. Immobilized Lipase D was used for selective esterification to produce FFA-D 6 times and was also used 6 times to hydrolyse tuna oil to enrich ω -3 PUFAs in MG-D. The remained activities of immobilized Lipase D for both reactions were 0.61 and 0.63 U/mg, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนการทำวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทนต์ เบญจกุล กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำต่างๆ ในการทำวิจัยและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และรองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทาร์พันธุ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาและวิจัย ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบพระคุณ พ่อ แม่ และพี่ๆ ที่ให้กำลังใจและกำลังทรัพย์ในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร และทุกท่านที่มีได้กล่าวมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำวิจัยและให้คำแนะนำ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

อัญชลี สาระใบก

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(11)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	30
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	31
วัสดุ	31
อุปกรณ์	32
วิธีการวิเคราะห์	32
วิธีการศึกษา	34
3. ผลและวิจารณ์	45
4. สรุป	73
เอกสารอ้างอิง	76
ภาคผนวก	82
ภาคผนวก ก การทำบริสุทธิ์น้ำมันปลาทูน่า	82
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์	83
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมี	97
ภาคผนวก ง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ	99
ประวัติผู้เขียน	113
ผลงาน	114

รายการตาราง

	หน้า
ตารางที่	
1. ปริมาณของ EPA และ DHA ที่ได้จากอาหารชนิดต่างๆ (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมอาหาร)	8
2. ตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตทางการค้า	15
3. การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไลเปสทางการค้า	17
4. องค์ประกอบของน้ำมันปลาทูน่า	47
5. องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่า	47
6. กิจกรรม โปรตีน และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสอิสระทางการค้า	49
7. กิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึงและกิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป	49
8. การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS โดยใช้ เอนไซม์ไลเปส PS อิสระและตรึงรูป	50
9. การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D โดยใช้ เอนไซม์ไลเปส D อิสระและตรึงรูป	58
10. การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D โดยใช้ เอนไซม์ไลเปส OF และ D ตรึงรูป	62
11. การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D โดยใช้ เอนไซม์ไลเปส D อิสระและตรึงรูป	62
12. การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ให้อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์โดยใช้ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Lipozyme® IM	68
13. การนำเอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูปมาใช้ซ้ำในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS	70
14. การนำเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปมาใช้ซ้ำในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D	71
15. การนำเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปมาใช้ซ้ำในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D	72

รายการตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่	
ตารางภาคผนวก ง1	99
ตารางภาคผนวก ง2	100
ตารางภาคผนวก ง3	101
ตารางภาคผนวก ง4	103
ตารางภาคผนวก ง5	104
ตารางภาคผนวก ง6	106
ตารางภาคผนวก ง7	107
ตารางภาคผนวก ง8	109
ตารางภาคผนวก ง9	110
ตารางภาคผนวก ง10	111
ตารางภาคผนวก ง11	112

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. โครงสร้างของกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆ	3
2. พันธะที่เกิดในสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว	5
3. ลักษณะการจัดเรียงของพันธะคู่ในสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมันไม่อิ่มตัว	5
4. ลักษณะคอนฟิกูเรชันแบบซิสและทรานส์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว	5
5. โครงสร้างทางเคมีของ EPA และ DHA	8
6. กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเพื่อลดปริมาณไขมันในเลือดโดย ω -3 PUFAs	11
7. กระบวนการอักเสบโดย ω -6 PUFAs และหยุดการอักเสบโดย ω -3 PUFAs	12
8. การจำแนกวิธีการตรึงเฮนไซม์ตามวิธี Kennedy และ Cabral	23
9. การตรึงรูปเฮนไซม์ไลเปสด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ	36
10. ขั้นตอนการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-PS	39
11. ขั้นตอนการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-D	40
12. ขั้นตอนการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ MG-D	43
13. ขั้นตอนการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ให้อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์	44
14. ลักษณะของน้ำมันปลาคุณภาพดีและน้ำมันปลาคุณภาพต่ำที่ผ่านการทำบริสุทธิ์	46
15. ผลของปริมาณเฮนไซม์ต่อการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS	53
16. ผลของปริมาณน้ำต่อการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS	53
17. ผลของอุณหภูมิในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS	54
18. ผลของระยะเวลาในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS	54
19. ผลของปริมาณเฮนไซม์ในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D	58
20. ผลของปริมาณน้ำในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D	59
21. ผลของอัตราส่วนของ FFA-PS ต่อลอริลแอลกอฮอล์ในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D	59
22. ผลของอุณหภูมิในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D	60
23. ผลของระยะเวลาในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D	60

รายการภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่	
24. ผลของปริมาณเอโนไซม์ในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D	65
25. ผลของปริมาณน้ำในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D	65
26. ผลของอุณหภูมิในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D	66
27. ผลของระยะเวลาในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D	66
ภาพภาคผนวก ข1	85
ภาพภาคผนวก ข2	87
ภาพภาคผนวก ข3	90
ภาพภาคผนวก ข4	91
ภาพภาคผนวก ข5	93
ภาพภาคผนวก ข6	95

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

อุตสาหกรรมแปรรูปปลาทูน่าบรรจุกระป๋องเป็นอุตสาหกรรมเพื่อการส่งออกที่ทำรายได้ให้ประเทศเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการแปรรูปก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือที่เป็นของแข็งหลายชนิด ได้แก่ หัว หาง ก้าง หนัง ประมาณร้อยละ 28-30 ซึ่งในวัสดุเศษเหลือเหล่านี้มีองค์ประกอบต่างๆ ที่มีคุณค่า เช่น หัวปลาทูน่า มีน้ำมันปลาเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 7-8 ของน้ำหนักหัวปลาไม่รวมกระดูก โดยในน้ำมันปลาทูน่ามีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่ม ω -3 (ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids, ω -3 PUFAs) สูงประมาณร้อยละ 34.23 ω -3 PUFAs (พรทิพย์ แซ่เตีย, 2537) ที่พบมากและมีบทบาทสำคัญในน้ำมันปลา ได้แก่ กรดอีพีเอ (Eicosapentaenoic acid, EPA) และกรดดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid, DHA) EPA และ DHA มีประโยชน์ทั้งในด้านที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เช่น มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาสมอง โดยเฉพาะด้านความจำและการเรียนรู้ การมองเห็น และสามารถใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ เพราะสามารถป้องกันหรือลดความเสี่ยงในการเป็นโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง โรคไขข้ออักเสบ โรคมะเร็ง เป็นต้น ปัจจุบันมีโรงงานแปรรูปปลาทูน่าบรรจุกระป๋องในประเทศไทยจำนวนทั้งหมด 21 โรงงาน มีกำลังการผลิตทั้งสิ้นประมาณ 647,000 ตันปลาสดต่อปี ซึ่งมีปริมาณน้ำมันปลาทูน่าเป็นผลพลอยได้รวมประมาณ 1,500-2,000 ตันต่อปี (สุมาลัย ศรีกำไลทอง และคณะ, 2538) การนำน้ำมันปลาทูน่าที่เป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมการแปรรูปปลาทูน่าบรรจุกระป๋องไปใช้โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารเสริมสุขภาพจึงเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มแก่น้ำมันปลาทูน่าได้ทางหนึ่ง

ω -3 PUFAs เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง มีพันธะคู่ในโมเลกุลหลายพันธะ ทำให้เกิดการเสียสภาพได้ง่ายเมื่ออยู่ในสภาวะที่รุนแรง เช่น สภาวะที่มีอนุมูลอิสระสูง หรืออาจถูกทำลายได้ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) หรือกระบวนการที่ส-ทรานส์ไอโซเมอไรเซชัน (cis-trans isomerization) เป็นต้น การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาในอดีตนิยมใช้วิธีการเคมีและกายภาพ ซึ่งมีสภาวะที่รุนแรง เช่น การใช้กรด-ด่าง กระบวนการวินเทอไรเซชัน (winterization) ยูเรียคอมเพล็กซ์ชัน (urea complexation) ชอร์ตพาทดิสทิลเลชัน (short-path

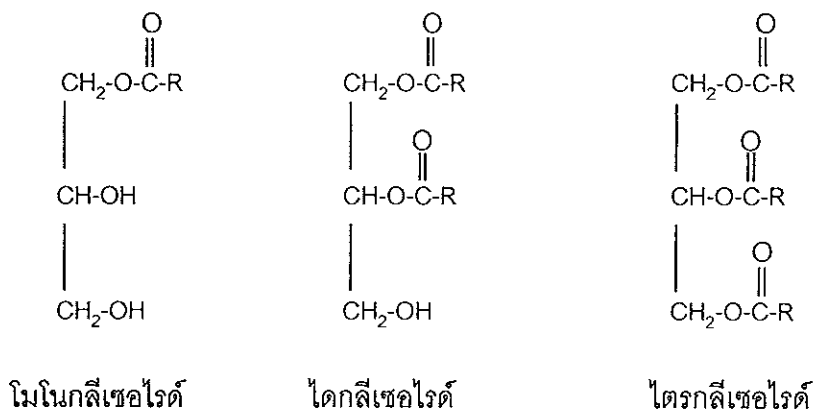
distillation) ทำให้ผลิตภัณฑ์น้ำมันปลาที่ได้เปลี่ยนสภาพได้ง่าย ได้ผลผลิตของ ω -3 PUFAs ต่ำ จึงมีการพัฒนาวิธีในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs โดยการใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาเคมีในน้ำมันปลา ทำให้ปริมาณ ω -3 PUFAs มีความเข้มข้นขึ้นซึ่งความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นอาจอยู่ในรูปที่เป็นกรดไขมันอิสระหรือกลีเซอไรด์ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยา การใช้เอนไซม์ไลเปสสามารถลดข้อจำกัดของวิธีการทางเคมีและกายภาพได้เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง ทำให้มีประสิทธิภาพสูงในการทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ในปริมาณเพียงเล็กน้อย ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์สูง ได้ผลผลิตสูง เกิดของเสียหรือวัสดุเหลือทิ้งน้อย ปฏิกิริยาเกิดได้ในสภาวะไม่รุนแรง เช่น เกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นการรักษาสภาพของ ω -3 PUFAs ไม่ให้ถูกทำลาย สามารถลดพลังงานและต้นทุนในการผลิตส่วนนี้ได้ และปัจจุบันมีการใช้วิธีการตรึงรูปเอนไซม์เพื่อเป็นการนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่

ดังนั้นแนวทางในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFA ในน้ำมันปลาที่บีบอัดได้จากส่วนหัวของปลาทูน่าโดยไลเปสตรึงรูปเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์น้ำมันปลาทูน่าที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้นซึ่งเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคในปัจจุบันที่นิยมรับประทานอาหารเพื่อสุขภาพกันมากขึ้น จึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจในการศึกษา นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง และช่วยลดปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นด้วย

การตรวจเอกสาร

1. ลิพิด (Lipids)

ลิพิดเป็นชีวโมเลกุลที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกระดับ มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (water insoluble) แต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม อีเธอร์ เบนซีน เป็นต้น ลิพิดที่พบมากที่สุด คือ ไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันมาสร้างพันธะเอสเทอร์กับหมู่ไฮดรอกซิล ทั้งสามหมู่ของกลีเซอรอลแต่สามารถพบไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) ด้วยเช่นกัน โครงสร้างของกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆ แสดงดังภาพที่ 1 (อาภัสรา ชมิดท์, 2537) ไตรกลีเซอไรด์ทุกชนิดไม่ละลายน้ำและไม่สร้างไมเซลล์ แต่พวกโมโนกลีเซอไรด์และไดกลีเซอไรด์มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ จึงมีความเป็นขั้วมากกว่าและสร้างไมเซลล์ได้ กลีเซอไรด์สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อีเธอร์ คลอโรฟอร์ม เบนซีน เป็นต้น พันธะเอสเทอร์ในไตรกลีเซอไรด์สามารถถูกทำลายได้ด้วยกรดหรือด่าง ปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยด่าง เรียกว่า สaponification) เป็นปฏิกิริยาที่ใช้ในการเตรียมสบู่ ซึ่งเป็นเกลือ



ภาพที่ 1 โครงสร้างของกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆ

ที่มา : อากัสตรา ชมิดท์ (2537)

ไฮเดียมหรือโปแตสเซียมของกรดไขมัน ลิปิดที่สามารถทำให้เกิดสบู่ได้ เรียกว่า saponifiable lipids ได้แก่ กลีเซอไรด์ ฟอสโฟกลีเซอไรด์ สฟิงโกลิปิด และซีมีง ส่วนลิปิดที่ไม่สามารถทำให้เกิดสบู่ได้ เรียกว่า non-saponifiable lipids ซึ่งเป็นลิปิดที่ไม่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบโมเลกุล ทำให้ไม่สามารถเกิดสบู่ได้เมื่อถูกย่อยสลายด้วยด่าง ซึ่งได้แก่ อนุพันธ์ของสเตอรอลและเทอร์ปีน ไตรกลีเซอไรด์มีสภาพทั้งที่เป็นของแข็งและของเหลว ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของกรดไขมัน (ประหยัด โภมารทัต, 2542) โดยจุดหลอมเหลวของกรดไขมันจะเพิ่มขึ้นตามความยาวของกรดไขมันและลดลงเมื่อจำนวนพันธะคู่เพิ่มขึ้น ไตรกลีเซอไรด์ในพืชมีจุดหลอมเหลวต่ำ เนื่องจากประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นส่วนใหญ่ เช่น กรดโอเลอิก กรดลิโนเลอิก หรือกรดลิโนเลนิก จึงมีสภาพเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ส่วนไตรกลีเซอไรด์ในสัตว์มีกรดไขมันอิ่มตัวเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ เช่น กรดปาล์มิติก กรดสเตียริก จึงมีจุดหลอมเหลวสูงและมีสภาพเป็นของแข็งหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่อุณหภูมิห้อง (อากัสตรา ชมิดท์, 2537)

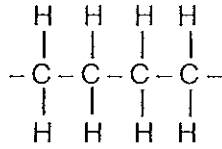
2. กรดไขมัน (Fatty acids)

กรดไขมันเป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่มีลักษณะไม่มีขั้วที่มีจำนวนคาร์บอน 4-24 อะตอมที่ปลายข้างหนึ่งเชื่อมกับหมู่คาร์บอกซิล 1 หมู่ โดยสายไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่ไม่มีขั้วนี้ทำให้กรดไขมันไม่ละลายน้ำ ในธรรมชาติกรดไขมันที่พบในลิปิดมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ และเป็นโซ่ยาวที่อิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัวก็ได้ โดยมีพันธะคู่ 1 คู่ หรือมากกว่า กรดไขมันแต่ละชนิดมีความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน ตำแหน่ง และจำนวนพันธะไม่อิ่มตัวไม่เท่ากัน (อากัสตรา ชมิดท์, 2537)

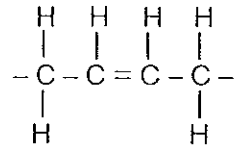
และแม้ว่าจำนวนพันธะคู่จะเปลี่ยนแปลงไปในกรดไขมันชนิดต่างๆ แต่กรดไขมันที่เป็นโซ่กิ่งหรือที่มีส่วนประกอบของวงแหวนหาได้ยากมาก (ประดิษฐ์ มีสุข, 2538) กรดไขมันที่ร่างกายของคนและสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ แต่จำเป็นต้องใช้ในการดำรงชีวิต จัดเป็นกรดไขมันจำเป็น (essential fatty acids) เช่น กรดไลโนเลอิก กรดไลโนเลนิก เป็นต้น ซึ่งกลีเซอไรด์ชนิดที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันเหล่านี้อยู่ด้วยกันจัดเป็นชนิดที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ส่วนกรดไขมันที่ร่างกายสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ จัดเป็นกรดไขมันไม่จำเป็น (nonessential fatty acids) (ประดิษฐ์ มีสุข, 2538)

จากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ พบว่าส่วนที่เป็นกลีเซอรอล (C_3H_5) มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 41 และน้ำหนักโมเลกุลของส่วนที่เป็นกรดไขมัน ($RCOO^-$) ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลที่แตกต่างกันในไตรกลีเซอไรด์แต่ละชนิด ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 650-970 โดยน้ำหนักโมเลกุลของกรดไขมันคิดเป็นร้อยละ 94-96 ของน้ำหนักโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ และนอกจากนี้ยังประกอบด้วยส่วนที่ใช้ทำปฏิกิริยา (reactive portion) ของโมเลกุล ทำให้กรดไขมันมีผลต่อคุณลักษณะของไตรกลีเซอไรด์ (Swern, 1979)

กรดไขมันที่คาร์บอนอะตอมทุกตัวในสายไฮโดรคาร์บอนสร้างพันธะกับไฮโดรเจนอะตอม 2 อะตอม และไม่มีพันธะคู่ เรียกว่า กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids) มีสูตรอย่างง่ายเป็น $C_nH_{2n}O_2$ และถ้ามีพันธะคู่ในสายไฮโดรคาร์บอนด้วย เรียกว่า กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) (ภาพที่ 2) ระดับความไม่อิ่มตัวขึ้นอยู่กับจำนวนพันธะคู่ในสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมันนั้น กรดไขมันไม่อิ่มตัวมีเสถียรภาพต่ำและเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและคอนฟิเจอร์ชันอย่างรวดเร็ว ในกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนพันธะคู่มากกว่า 2 พันธะ จัดเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acids) หากพันธะคู่ในสายไฮโดรคาร์บอนนั้นถูกคั่นด้วยคาร์บอนอะตอมอย่างน้อย 2 อะตอม จัดเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวแบบนอนคอนจูเกต (non-conjugated fatty acids) และถ้าพันธะคู่ถูกคั่นด้วยคาร์บอนอะตอมเพียงอะตอมเดียวอย่างสม่ำเสมอในสายไฮโดรคาร์บอน จัดเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวแบบคอนจูเกต (conjugated fatty acids) (ภาพที่ 3) ส่วนคอนฟิเจอร์ชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นไปได้ทั้งแบบซิสและทรานส์ (cis- and trans-configuration) (ภาพที่ 4)



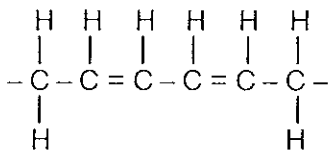
กรดไขมันอิ่มตัว



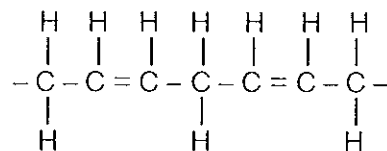
กรดไขมันไม่อิ่มตัว

ภาพที่ 2 พันธะที่เกิดในสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว

ที่มา : Swern (1979)



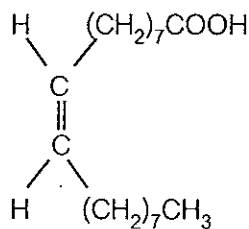
กรดไขมันไม่อิ่มตัวแบบคอนจูเกต



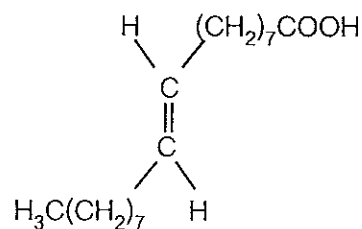
กรดไขมันไม่อิ่มตัวแบบนอนคอนจูเกต

ภาพที่ 3 ลักษณะการจัดเรียงของพันธะคู่ในสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมันไม่อิ่มตัว

ที่มา : Swern (1979)



คอนฟิเจอร์ชันแบบซีส



คอนฟิเจอร์ชันแบบทรานส์

ภาพที่ 4 ลักษณะคอนฟิเจอร์ชันแบบซีสและทรานส์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว

ที่มา : อภัสสรฯ ฆมิดท์ (2537)

กรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวมีคอนฟิเจอร์ชันต่างกัน เนื่องจากกรดไขมันอิ่มตัวมีเฉพาะพันธะเดี่ยวที่มีการหมุนแบบเสรี (freedom of rotation) ทำให้หางไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมันอิ่มตัวอยู่ในคอนฟิเจอร์ชันแบบซิกแซกในแนวตรง โดยที่พันธะระหว่างคาร์บอนกับคาร์บอนทำมุมกัน 111 องศา ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวเนื่องจากมีพันธะคู่ที่หมุนไม่ได้ จึงทำให้สายโซ่ไฮโดรคาร์บอนแข็งแรง คอนฟิเจอร์ชันแบบซีสของพันธะคู่ที่พบในกรดไขมันเอียงทำมุม 30 องศา กับสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน ทำให้สายโซ่ไฮโดรคาร์บอนงอและหดสั้นลง ในขณะที่คอนฟิเจอร์ชันแบบทรานส์เหมือนกรดไขมันอิ่มตัว คอนฟิเจอร์ชันแบบซีสมีเสถียรภาพน้อยกว่าแบบทรานส์ ดังนั้นถ้าให้ความร้อนและมีตัวเร่งปฏิกิริยาจะสามารถเปลี่ยนคอนฟิเจอร์ชันแบบซีสเป็นแบบทรานส์ได้ (อาภัสสรา ชมิทธิ์, 2537 และ Swern, 1979)

3. น้ำมันปลา

น้ำมันปลาเป็นส่วนของน้ำมันที่สกัดได้จากส่วนต่างๆ ของปลา เช่น กล้ามเนื้อสีดำ อวัยวะภายใน ส่วนหัว และเบ้าตา ดังนั้นน้ำมันปลาจึงหมายถึงน้ำมันที่สกัดได้จากปลาทั้งตัว น้ำมันปลาแตกต่างจากน้ำมันตับปลา คือ น้ำมันตับปลาเป็นน้ำมันที่ได้มาจากเฉพาะส่วนตับของปลาเท่านั้น โดยทั่วไปมักนิยมนผลิตจากตับปลาคอด น้ำมันตับปลามีองค์ประกอบของวิตามินเอและดีสูง จึงมักใช้บริโภคเป็นแหล่งของวิตามินเอและดี

น้ำมันปลามีลักษณะคล้ายกับน้ำมันโดยทั่วไป คือ มีองค์ประกอบหลักเป็นไตรกลีเซอไรด์มากกว่าร้อยละ 90 แต่กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันปลาแตกต่างจากน้ำมันทั่วไป โดยกรดไขมันในน้ำมันปลาส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่มีโซ่ไฮโดรคาร์บอนยาวประมาณ 14-22 อะตอม มีพันธะคู่ในโมเลกุล 4-6 พันธะ ในปริมาณสูง มีคอนฟิเจอร์ชันแบบซีส และโดยทั่วไปจะอยู่ในตำแหน่งที่ 2 (beta- position) ในโมเลกุลน้ำมัน (Connor *et al.*, 1990; Stansby, 1990; Zuyi and Ward, 1993) ซึ่งในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์มีองค์ประกอบของกรดไขมันทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่พบมากและมีบทบาทสำคัญในน้ำมันปลาเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในกลุ่ม ω -3 ซึ่งได้แก่ Eicosapentaenoic acid หรือ EPA มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 20 อะตอม มีพันธะคู่ 5 พันธะ และ Docosahexaenoic acid หรือ DHA มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 22 อะตอม มีพันธะคู่ 6 พันธะ (Yongmanitchai and Ward, 1989; Stansby, 1990) แสดงดังภาพที่ 5 นอกจากนี้ในน้ำมันปลายังประกอบด้วยสารประกอบอื่นๆ อีก เช่น ฟอสโฟลิเซอไรด์ กลีเซอรอล อีเทอร์ ไฮโดรคาร์บอน แวกเอสเทอร์ และวิตามินที่ละลายในน้ำมัน ซึ่งองค์ประกอบต่างๆ เหล่านี้จะแตกต่างกันตามแหล่งของน้ำมัน (Stansby, 1990) ในน้ำมันปลามี ω -3 PUFAs เป็นองค์

ประกอบอยู่สูงกว่าอาหารโดยทั่วไป แสดงได้ดังตารางที่ 1

ปริมาณน้ำมันและองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันแตกต่างกันตามชนิด อายุ และเพศของปลา ตลอดจนอาหารและอุณหภูมิของน้ำที่ปลานั้นอาศัยอยู่ (Ackman, 1989) โดยจากการทดลองของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านที่ผ่านมาพบว่าปริมาณน้ำมันและกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่ม ω -3 ในปลาน้ำจืดมีปริมาณต่ำกว่าในปลาทะเล

Chetty และคณะ (1989) ศึกษาส่วนประกอบของกรดไขมันในปลาน้ำจืด 18 สายพันธุ์ จากอเมริกาใต้ พบว่าในปลาเหล่านั้นมี EPA และ DHA ในปริมาณต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับปลาทะเล แต่ในปลาน้ำจืดเหล่านี้มีกรดไขมันพวก arachidonic acid และ linoleic acid ในปริมาณสูง โดยมี saturated fats และ monounsaturated fats ประมาณร้อยละ 33 และ 35 ตามลำดับ

Karahadian และ Lindsay (1989) วิเคราะห์องค์ประกอบของ ω -3 PUFAs ในปลาน้ำจืดพันธุ์ *Salvelinus sp.* ที่อำเภอ Great ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าในเนื้อปลามี EPA และ DHA อยู่ประมาณร้อยละ 4.0 และ 7.7 ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ

Aggelousis และ Lazos (1991) ได้วิเคราะห์ ω -3 PUFAs ในเนื้อปลาน้ำจืดจำนวน 8 ชนิด จากประเทศกรีซ พบว่ามีปริมาณ EPA และ DHA ประมาณร้อยละ 6.0-11.8 และ 4.0-15.3 ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ

Zlatanov และ Sagredos (1993) วิเคราะห์ส่วนประกอบของ ω -3 PUFAs ในปลาทะเล จากบริเวณทะเลเมดิเตอร์เรเนียนจำนวน 16 สายพันธุ์ พบว่ามีปริมาณ EPA และ DHA มากกว่าร้อยละ 30 ของกรดไขมันทั้งหมด โดยปลาทะเลพันธุ์ *Scomber scombrus* มีปริมาณ EPA และ DHA สูงที่สุด

Nichols และคณะ (1994) วิเคราะห์ส่วนประกอบของกรดไขมันในปลาทะเลจำนวน 4 สายพันธุ์ จากทะเลแอนตาร์กติก พบว่าปลาทะเลทั้ง 4 สายพันธุ์ มีปริมาณ PUFAs ในปริมาณสูง ประมาณร้อยละ 32.6-56.3 ของกรดไขมันทั้งหมด โดยใน PUFA มีกลุ่มของ ω -3 สูงที่สุด

Shimada และคณะ (1994) ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่าที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีกรดไขมันที่สำคัญ ได้แก่ EPA และ DHA เท่ากับร้อยละ 8.2 และ 30.3 ตามลำดับ



all-cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid



all-cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid

ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ EPA และ DHA

ที่มา : Yongmanitchai and Ward (1989)

ตารางที่ 1 ปริมาณของ EPA และ DHA ที่ได้จากอาหารชนิดต่างๆ (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมอาหาร)

รายการอาหาร	EPA	DHA
ข้าวขาวที่ผ่านการขัดสี	ND	ND
ถั่วเหลือง	ND	ND
เนื้อวัว	ND	ND
เนื้อไก่	54	54
เนื้อหมู	ND	ND
นมวัว	ND	ND
ปลาทูน่า (Tuna)	1288	2877
ปลาข้างเหลือง (Yellowtail)	898	1785
ปลาทู (Mackerel)	1214	1781
ปลาไหล (Eel)	742	1332
ปลาซาร์ดีน (Sardine)	1381	1136
ปลาเทราต์ (Rainbow Trout)	274	983
ปลาแซลมอน (Salmon)	492	820
ปลาไหลทะเล (Conger Eel)	472	661
ปลาโอลาย (Bonito)	78	310
ปลาตะเพียนทะเล (Sea Bream)	157	297
ปลาลิ้นหมา (Flatfish)	210	202

หมายเหตุ ND : น้อยมากหรือตรวจหาไม่พบ

ที่มา : Suzuki (1993)

ประโยชน์ของน้ำมันปลา

ประโยชน์ของ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลามีมากมาย ไม่ว่าจะเป็นบทบาทต่อการป้องกันหรือลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง โรคไขข้ออักเสบ โรคมะเร็ง และโรคอื่นๆ และนอกจากนี้ยังมีบทบาทต่อการพัฒนาสมองและการมองเห็นด้วย

1. บทบาทในการลดปริมาณไขมันในหลอดเลือดทำให้การอุดตันในหลอดเลือดลดลง

สารไขมันไหลเวียนอยู่ในร่างกายของเราได้โดยการปะปนไปในกระแสเลือด แต่เนื่องจากสารไขมันมีความหนาแน่นต่ำทำให้มีลักษณะเบาและลอยตัว ดังนั้นจึงต้องรวมตัวกับโมเลกุลของโปรตีนด้วยแรงดึงดูดทางกายภาพเกิดเป็นสารไลโปโปรตีน แล้วไหลเวียนไปตามกระแสเลือดเพื่อถ่ายสารไขมันให้กับส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ ส่วนภาวะไขมันในเลือดสูง หมายถึง การมีระดับของไตรกลีเซอไรด์ หรือคอเลสเตอรอล หรือทั้งสองชนิดสูงขึ้นเกินระดับปกติในกระแสเลือด ดังนั้นการมีภาวะไขมันในเลือดสูงอาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากการมีไลโปโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งไขมันชนิดนั้นๆ สูงขึ้นนั่นเอง (Kinsella, 1986; 1988) เหตุผลที่ทำให้ไขมันปลาซึ่งมีองค์ประกอบของ ω -3 PUFAs สูงสามารถลดระดับไขมันหรือไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอลในเลือดได้ เนื่องจาก ω -3 PUFAs เหล่านี้ทำหน้าที่แตกต่างจากกรดไขมันอิ่มตัว คือร่างกายใช้ ω -3 PUFAs ในการสร้างเป็นโมเลกุลโครงสร้าง เช่น ฟอสโฟลิพิดและโมเลกุลทำงาน เช่น พรอสตาแกลนดิน (prostaglandins) ไม่ใช่โมเลกุลพลังงาน ในขณะที่ร่างกายจะใช้กรดไขมันอิ่มตัวต่างๆ ในลักษณะที่เป็นโมเลกุลพลังงาน และเมื่อใช้ไม่หมดก็จะเก็บสะสมไว้ตามส่วนต่างๆ ของร่างกายรวมถึงตามผนังหลอดเลือด ถ้ามีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ก็เป็นการเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดอุดตันได้ง่าย โดยปกติร่างกายจะใช้กรดอะราคิโดนิค (arachidonic acid, AA) ซึ่งพบมากในน้ำมันพืช และ EPA เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเมตาบอไลต์ (metabolites) ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า ไอโคซานอยด์ (eicosanoids) เช่น พรอสตาแกลนดิน ทรอมโบแซน (thromboxane, TXA₂) พรอสตาไซคลิน (prostacyclin, PGI₂) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยาต่างๆ ของระบบหลอดเลือด ส่วน DHA ตัวมันเองไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างไอโคซานอยด์ แต่ในบางสภาวะ DHA สามารถเปลี่ยนกลับมาเป็นกรดโดโคซะเพนตะอีโนอิก (docosapentaenoic acid, DPA) และย้อนกลับมาเป็น EPA ได้ ไอโคซานอยด์เป็นสารประกอบที่มีลักษณะคล้ายพรอสตาแกลนดิน โดยไอโคซานอยด์ที่เปลี่ยนรูปมาจาก AA ได้แก่ TXA₂ และ PGI₂ แสดงดังภาพที่ 6 ซึ่ง TXA₂ มีคุณสมบัติในการเร่งการรวมตัวของเกล็ดเลือดและการหดตัวของหลอดเลือดส่วน PGI₂ มีคุณสมบัติตรงกันข้ามกันคือป้องกันการรวมตัวของเกล็ดเลือดและช่วยในการขยายตัวของหลอดเลือด โรคหลอดเลือดอุดตันเกิดขึ้นเมื่อสภาวะ

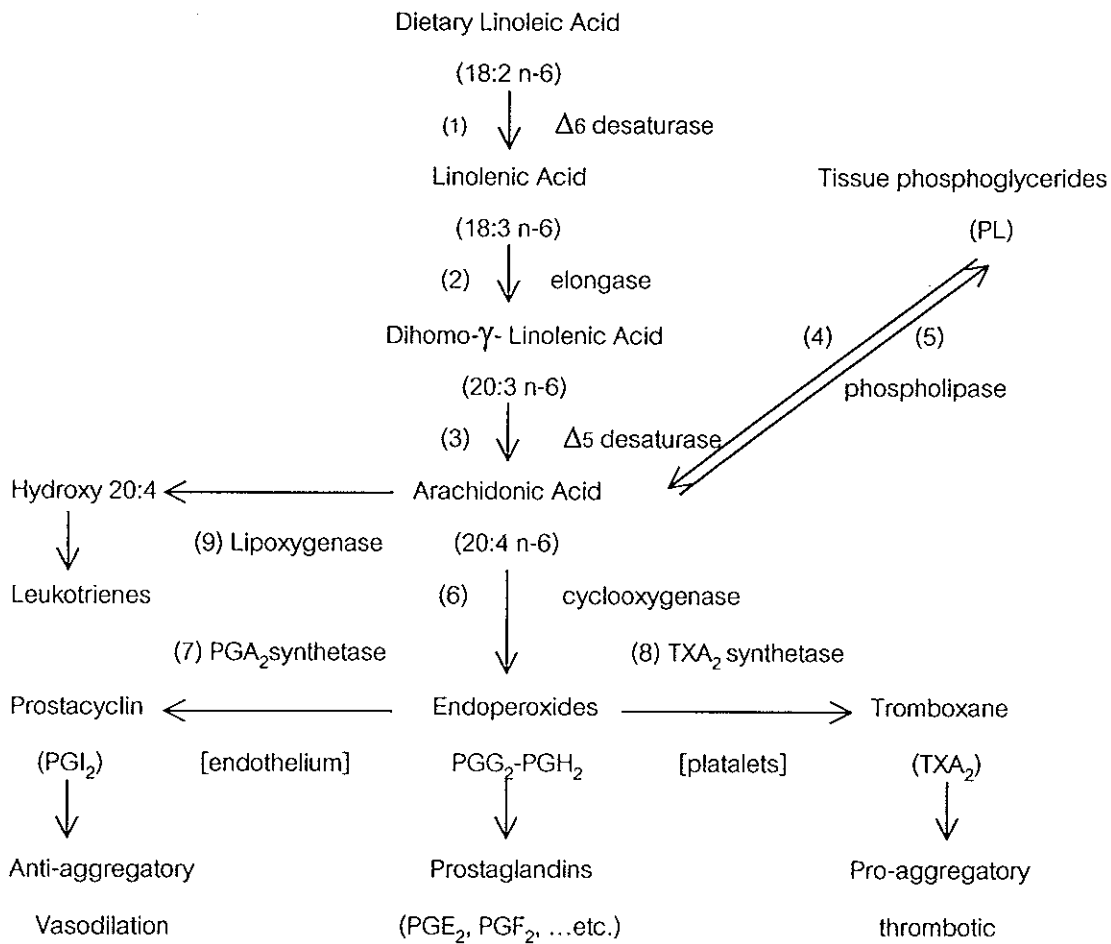
สมดุลของ TXA_2 และ PGI_2 ผิดปกติ โดยปกติแล้วสารไอโคซานอยด์จะเปลี่ยนรูปมาจาก AA เป็นส่วนใหญ่ แต่หากได้รับประทาน EPA มากๆ จนกระทั่งอัตราส่วนของ EPA ต่อ AA มากขึ้น ทำให้ EPA มีผลในการลดการเปลี่ยนของ AA ไปเป็น PGI_2 และ TXA_2 โดย EPA จะทำตัวเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไอโคซานอยด์ที่เป็นอนุพันธ์ของ EPA แทน ซึ่งได้แก่ TXA_3 และ PGI_3 แต่ TXA_3 ไม่มีคุณสมบัติในการในการเร่งการรวมตัวของเกล็ดเลือดและการหดตัวของหลอดเลือด ส่วน PGI_3 มีคุณสมบัติทั่วไปเหมือนกับ PGI_2 ดังนั้นเมื่อเราได้รับประทาน EPA มากขึ้น ทำให้ปริมาณ TXA_2 ลดลง การจับตัวเป็นก้อนของเกล็ดเลือดลดลงทำให้เลือดมีความหนืดลดลง ในขณะที่ PGI_2 และ PGI_3 เพิ่มขึ้น มีการขยายตัวของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น ทำให้การไหลเวียนของเลือดสะดวกขึ้น ลดความเสี่ยงต่อการตีบตันของหลอดเลือดที่จะนำเลือดไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น ลดการอุดตันของหลอดเลือดที่จะไปเลี้ยงหัวใจ ป้องกันกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด และช่วยลดความดันโลหิตสำหรับผู้ที่มีความเสี่ยงต่อภาวะความดันโลหิตสูง (Kinsella, 1986; 1988; Yongmanitchai and Ward, 1989)

2. บทบาทในการลดการอักเสบและบวม

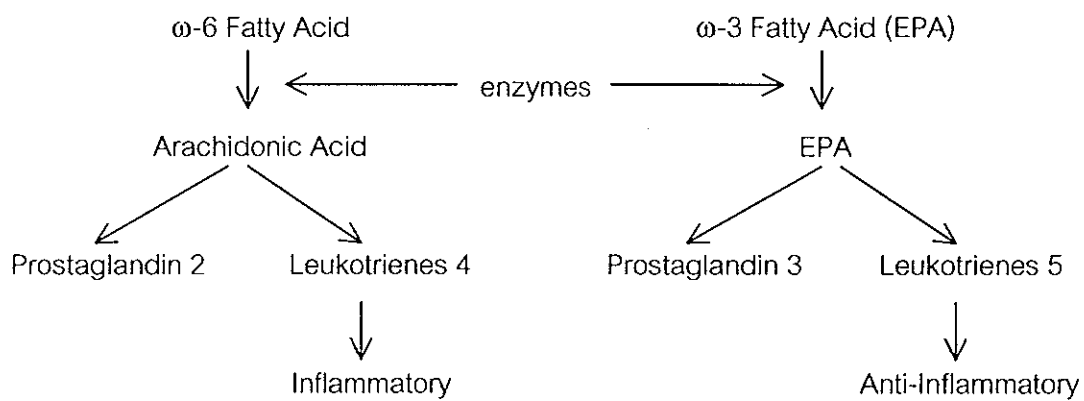
การอักเสบและบวมเกิดเนื่องจากการที่เอนไซม์ไลพอกซีจีเนส (lipoxygenase) ในร่างกายเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน AA ให้เป็นอนุพันธ์ของมันที่ชื่อว่า ลิวโคทริน 4 (leukotrine 4) ที่เป็นตัวการทำให้เกิดอาการเจ็บปวดที่ข้อ การเพิ่มระดับ EPA ในอาหารที่รับประทานเข้าไป มีผลให้ EPA ไปขัดขวางกระบวนการสร้าง AA ทำให้ปริมาณการสร้างลิวโคทริน 4 ลดลงด้วย ขณะเดียวกันก็ไปเร่งปฏิกิริยาการสร้างลิวโคทริน 5 แทนซึ่งไม่มีฤทธิ์ก่อให้เกิดการอักเสบและบวม (ภาพที่ 7) ดังนั้นการรับประทานน้ำมันปลาที่มี EPA สามารถลดความเสี่ยงหรือรักษาอาการอักเสบและปวดบวมของโรคไขข้ออักเสบและรูมาตอยด์ได้ (Yongmanitchai and Ward, 1989)

3. บทบาทในการพัฒนาสมองและการมองเห็น

เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทในสมองเป็นสารประกอบพอลิฟอสโฟไลปิดที่มีองค์ประกอบหลักเป็น DHA โดย DHA จะอยู่ในตำแหน่งที่ 2 ในโมเลกุลของฟอสโฟลิเซอไรด์ และ DHA เป็นส่วนสำคัญในการเสริมสร้างการเจริญของปลายประสาทที่เรียกว่า เดนไดรต์ (dendrites) ซึ่งทำหน้าที่ในการถ่ายทอดคำสั่งหรือข้อมูลจากสมองส่วนกลางไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย และนอกจากนี้ยังพบว่า DHA เป็นองค์ประกอบสำคัญในเซลล์รูปแท่งและรูปกรวย (rod and cone cells) ในเรตินาของดวงตา แสดงให้เห็นว่า DHA มีความสัมพันธ์โดยตรงกับพัฒนาการด้านความ



ภาพที่ 6 กระบวนการสร้างสารกลุ่มไอโคซานอยด์เพื่อลดปริมาณไขมันในเลือดโดย ω -3 PUFAs
ที่มา : Kinsella (1986)



ภาพที่ 7 กระบวนการอักเสบโดย ω -6 PUFAs และหยุดการอักเสบโดย ω -3 PUFAs
ที่มา : มณีรัตน์ อังศุศิริวงศ์ (2540)

จำ การเรียนรู้ และการมองเห็น ถ้าร่างกายขาด DHA ทำให้เกิดผลกระทบต่อการเรียนรู้ของเซลล์สมอง ทำให้พัฒนาการทางด้านความจำและการเรียนรู้เป็นไปอย่างเชื่องช้า และอาจมีปัญหาทางด้าน การมองเห็นได้ (Connor *et al.*, 1990; Suzuki, 1993)

ร่างกายส่วนสมองของมนุษย์จะมีการแบ่งเซลล์สมองและเจริญเติบโตตั้งแต่เป็นทารกอยู่ในครรภ์มารดา และหลังคลอดในช่วงหนึ่งปีแรกเท่านั้น ในช่วงเวลาดังกล่าวทารกควรได้รับ DHA ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อใช้ในการเสริมสร้างการเรียนรู้ของเซลล์สมองและเซลล์ในเรตินาของดวงตาอย่างเต็มที่ ในระหว่างตั้งครรภ์ทารกจะต้องได้รับ DHA จากมารดาและได้รับ DHA จากน้ำนมมารดาหลังคลอดในปริมาณที่เพียงพอ ดังนั้นเมื่อทารกไม่ได้รับน้ำนมมารดาก็จะมีภาวะเสี่ยงต่อการขาด DHA จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ทารกควรได้รับเพิ่มขึ้นจากอาหารอื่นๆ ให้มีปริมาณที่เพียงพอ (Suzuki, 1993) หากหญิงมีครรภ์ที่ได้รับ DHA น้อยเกินไป และยังมีภาวะขาด DHA ภายหลังคลอด ทำให้ทารกที่คลอดออกมามีขาด DHA ที่จำเป็นในการเจริญของเซลล์สมองและเซลล์ด้านการมองเห็น ทำให้เด็กทารกมีปัญหาเกี่ยวกับการมองเห็นภายใน 4 เดือนหลังคลอด (Connor *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์สมองของมนุษย์จะลดลงเมื่อมนุษย์มีอายุมากขึ้น ทำให้คนชรามักเป็นโรคความจำในระยะสั้นเสื่อม ดังนั้นหากมีการบริโภคน้ำมันปลาเป็นประจำ ทำให้ได้รับ DHA ในปริมาณที่เพียงพออย่างสม่ำเสมอ ทำให้เพิ่มความจำในคนสูงอายุได้ (Suzuki, 1993)

4. เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (Lipase, E.C. 3.1.1.3, Glycerol ester hydrolase) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase) ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในสภาวะที่มีน้ำ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมัน และกลีเซอรอล ปฏิกิริยาสามารถเกิดแบบย้อนกลับได้เมื่อสภาวะต่างๆ ในปฏิกิริยาเหมาะสม และสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบที่มีหมู่คาร์บอกซิลที่ไม่ใช่ไตรกลีเซอไรด์ได้อีกด้วย (Macrae, 1983; Malcata *et al.*, 1992) เอนไซม์ไลเปสสามารถใช้สังเคราะห์ได้หลายชนิด มีความจำเพาะเจาะจงกับสับสเตรทสูง เร่งปฏิกิริยาได้หลายแบบ เกิดปฏิกิริยาได้ที่สภาวะไม่รุนแรง ทำให้เอนไซม์ไลเปสได้รับความสนใจมากในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ทดแทนกระบวนการผลิตแบบเดิมที่มักใช้สภาวะรุนแรง เช่น ใช้สารเคมีและอุณหภูมิสูง ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่ได้มาตรฐานที่ต้องการ ในการผลิตต้องใช้พลังงานและต้นทุนสูง และยังเป็นอันตรายกับสิ่งแวดล้อมด้วย อุตสาหกรรมที่มีการนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ในกระบวนการผลิต เช่น อุตสาหกรรมผงซักฟอก นม น้ำมันปลา ยาและเครื่องสำอางต่างๆ รวมทั้งมีการนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีการปน

เป็อนของน้ำมันด้วย (Balcao *et al.*, 1996) นับได้ว่าเอนไซม์ไลเปสมีบทบาทสำคัญต่อการรักษาสิ่งแวดล้อม ทั้งยังเป็นการลดพลังงานและต้นทุนการผลิตด้วย

แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติหรือได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ ซึ่งอาจผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้งที่อยู่ภายในเซลล์และปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (Balcao *et al.*, 1996) เอนไซม์ไลเปสจากพืช เช่น เอนไซม์ไลเปสจากเมล็ดละหุ่ง เมล็ดฝ้าย กล้วย พืชพวกข้าวสาลี ข้าวไรย์ ข้าวบาร์เลย์ เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์มักพบในเนื้อเยื่ออวัยวะ เช่น เอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ และซีรัม สำหรับเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนนิยมนำมาใช้กันมากเนื่องจากมีความเข้มข้นสูงและแยกสกัดออกมาได้ง่าย (Schwimmer, 1981) เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน เพราะมีความคงตัวสูงกว่าเอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์ (Malcata *et al.*, 1992; Balcao *et al.*, 1996) สามารถผลิตได้ในปริมาณมากเนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตง่าย และมีคุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากนี้สามารถเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยได้โดยการปรับปรุงทางสายพันธุ์ ทำให้ในปัจจุบันมีเอนไซม์ไลเปสทางการค้าหลายชนิดที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (ตารางที่ 2) จุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และการควบคุมสภาวะในการผลิต ยีสต์ที่นิยมนำมาผลิตเอนไซม์ไลเปสทางการค้า ได้แก่ *Candida cylindracea* หรือ *Candida rugosa* (Veeraragavan and Gibbs, 1989) สำหรับราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสอยู่ในกลุ่ม *Rhizomucor* และแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสทางการค้า ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* (Kazlauskas and Bornscheuer, 1997) เป็นต้น

การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไลเปสทางการค้า

การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไลเปสทางการค้าตามแหล่งของจุลินทรีย์บางครั้งพบว่าเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่างๆ บางชนิดมีโครงสร้างที่เหมือนกัน ดังนั้น Kazlauskas และ Bornscheuer (1997) เสนอว่าวิธีการที่ง่ายที่สุดในการแบ่งกลุ่ม คือ การแบ่งตามการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในโครงสร้างโปรตีนของเอนไซม์ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 3) คือ เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ ยีสต์และรา และแบคทีเรีย สำหรับเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์และรา แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม *Candida rugosa* และกลุ่ม *Rhizomucor* ส่วนเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มของ *Pseudomonas* และกลุ่ม *Staphylococcus*

ตารางที่ 2 ตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตทางการค้า

ชนิด	แหล่งที่มา	ชื่ออื่น ๆ	บริษัทที่ผลิตทางการค้า
Mammalian lipases			
PPL	Porcine pancreas		Amano, Sigma, Fluka, Boehring Mannheim
CE (BSSL)	Pancreatic cholesterol esterase		Genzyme, Sigma
Fungal lipases			
CRL	<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida cylindracea</i>	Altus Biologics, Sangyo, Amano, Boehring Mannheim
CAL-A	<i>Candida antarctica</i> A		Boehring Mannheim
CAL-B	<i>Candida antarctica</i> A		Novo Nordisk
CLL	<i>Candida lipolytica</i>		Boehring Mannheim, Sigma, Novo Nordisk
GCL	<i>Geotrichum candidum</i>		Amano
HLL	<i>Humicola lanuginosa</i>	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Boehring Mannheim, Novo Nordisk
PcamL	<i>Penicillium caamembertii</i>	<i>P. cyclopium</i>	Amano
RJL	<i>Rhizomucor javanicus</i>	<i>Mucor javanicus</i>	Amano
RML	<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>Mucor miehei</i>	Boehring Mannheim, Amano, Novo Nordisk, Fluka, Sigma
ROL	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>R. javanicus</i> , <i>R. delemar</i> , <i>R. niveus</i>	Amano, Fluka, Sigma, Seikagaku Kogyo
ANL	<i>Aspergillus niger</i>		Amano
ProqL	<i>Penicillium roqueforti</i>		Amano

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชนิด	แหล่งที่มา	ชื่ออื่น ๆ	บริษัทที่ผลิตทางการค้า
Bacterial lipases			
PCL	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	Altus Biologics, Fluka, Sigma, Amano, Boehring Mannheim
PCL-AH	<i>Pseudomonas cepacia</i>		Amano
PFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Amano, Biocatalysts
Pfragil	<i>Pseudomonas fragi</i>		Wako Pure Chemical
CVL	<i>Chomobacterium viscosum, Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas glumae</i>	Sigma, Genzyme, Asahi Chemical, Biocatalysts, Amano
BTL2	<i>Bacillus thermocatenuatus, Alcaligenes sp.</i>		Boehring Mannheim, Meito Sangyo

ที่มา : ดัดแปลงจาก Kazlauskas และ Bornscheuer (1997)

ตารางที่ 3 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไลเปสทางการค้า

กลุ่มของเอนไซม์ไลเปส	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน, kD)	ตัวอย่างเอนไซม์ไลเปส
เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์	50	PPL
เอนไซม์ไลเปสจากยีสต์และรา		
<i>Candida rugosa</i>	59-65	CRL, GCL, CE
<i>Rhizomucor</i>	29-42	CAL-B, RML, ROL, PcamL, HLL
เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย		
<i>Pseudomonas</i>	30-35	PCL,, PFL, CVL
<i>Staphylococcus</i>	68-73	BTL2
เอนไซม์ไลเปสที่ยังไม่สามารถ แบ่งกลุ่มได้		ANL, CAL-A, CLL

ที่มา : Kazlauskas และ Bornscheuer (1997)

เอนไซม์ไลเปสในกลุ่ม *Candida rugosa* ได้แก่ *Candida rugosa* (CRL), *Geotrichum candidum* (GCL) และ pancreatic cholesterol esterase (CE) เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลใหญ่ (59-65 kD) แต่ *Candida antarctica* B (CAL-B) มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (30-35 kD) จึงจัดไว้ในกลุ่ม *Rhizomucor* แม้ว่าจะเป็นเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ *Candida* ก็ตาม ซึ่งส่วนเอนไซม์ไลเปสในกลุ่ม *Rhizomucor* เป็นเอนไซม์ที่ได้จากราหลายชนิด เช่น *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Penicillium camembertii* (PcamL), *Humicola lanuginosa* (HLL) สำหรับในกลุ่ม *Pseudomonas* เป็นเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* ทุกตัวรวมทั้งเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* ด้วย

เอนไซม์ไลเปสบางตัวยังไม่ได้แบ่งกลุ่ม เนื่องจากยังไม่ทราบการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ชัดเจน ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida antarctica* A (CAL-A) และแม้ว่าทราบการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน แต่มีลักษณะที่เหมือนกับเอนไซม์ไลเปสในแต่ละกลุ่มน้อยมากจึงจัดไว้ในกลุ่มนี้ (Hoegh *et al.*, 1995)

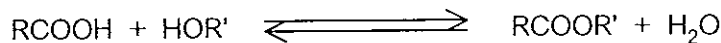
การทำงานของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสละลายน้ำได้แต่สับสเตรทของเอนไซม์ไลเปสซึ่งได้แก่ไขมันและน้ำมันมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจึงเกิดได้เฉพาะที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างส่วนของน้ำกับสับสเตรทเท่านั้น ดังนั้นเพื่อให้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ต้องทำให้พื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรทเพิ่มขึ้น (Macrae, 1983; Malcata *et al.*, 1992; Balcao *et al.*, 1996) สำหรับเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์โดยทั่วไปทำงานได้ดีในช่วง พีเอช 5.6-8.5 มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง และส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ความคงตัวต่ออุณหภูมิขึ้นกับแหล่งผลิต พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์ เช่น เชื้อ *Pseudomonas* สายพันธุ์ที่ทนความร้อนสูงได้สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 100 องศาเซลเซียส (Malcata *et al.*, 1992) Yamane (1987) แบ่งความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเอสเทอร์ (hydrolysis of esters) เป็นการย่อยสลายเอสเทอร์ด้วยน้ำ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมัน กับกลีเซอรอล แอลกอฮอล์ หรือไกลคอล เช่น เมื่อย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันกับกลีเซอรอล

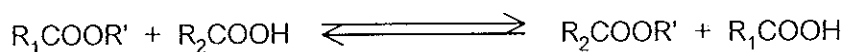


2. กลุ่มที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ (synthesis of esters) เป็นการสังเคราะห์เอสเทอร์จากกรดไขมันกับกลีเซอรอล แอลกอฮอล์ หรือไกลคอล ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์กับน้ำ ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของการย่อยสลายเอสเทอร์ (reverse of hydrolysis)

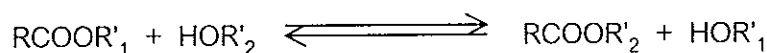


3. กลุ่มที่เร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชัน (interesterification) เป็นปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์ใหม่ โดยเกิดจากการย้ายหมู่เอซิลหรือกรดไขมันบนโมเลกุลของสารประกอบเอสเทอร์ ไปสร้างพันธะใหม่กับโมเลกุลอื่น มี 4 ชนิด คือ

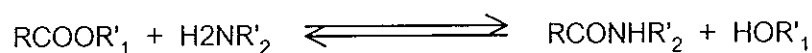
3.1 ปฏิกิริยาอะซิโดไลซิส (acidolysis)



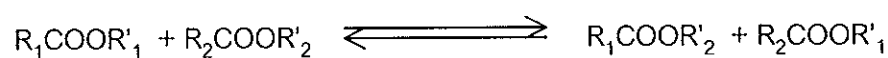
3.2 แอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis)



3.3 อะมิโนไลซิส (aminolysis)



3.4 ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification)



เอนไซม์ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

Malcata และคณะ (1992) แบ่งความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มของไลปิด เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อโครงสร้างสเตอริโอไอโซเมอร์ของสับสเตรท และเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อหลายๆ อย่างรวมกัน

Macrae (1983) แบ่งเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ ดังนั้นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จะเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอลในปริมาณสูง แต่อาจจะพบไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น

กลุ่มที่ 2 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเมื่อไตรกลีเซอไรด์ถูกย่อยสลายจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดไขมัน, 1,2-(2,3)-ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่ว่า 1,2-(2,3)-ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ จะไม่คงตัวถ้าปล่อยให้เกิดปฏิกิริยานานเกินไปจะเกิดการย้ายหมู่เอซิลขึ้น ทำให้ได้เป็น 1,3-ไดกลีเซอไรด์ และ 1(3)-โมโนกลีเซอไรด์ และจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอลในที่สุด ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้มาใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของ EPA และ DHA จากน้ำมันปลาเอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อ *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และในพวก *Rhizopus* หลายสายพันธุ์

กลุ่มที่ 3 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งส่วนใหญ่เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์บางพวก เช่น เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Geotrichum candidum* ซึ่งมีความจำเพาะต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่มีพันธะคู่เป็นคอนฟิเจอร์เช่นแบบซิสอยู่ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่ 9 และ 10

5. การตรึงเอนไซม์ไลเปส

เนื่องจากเอนไซม์อิสระมีความคงตัวในปฏิกิริยาต่ำ การแยกเอนไซม์ที่เหลือออกจากผลิตภัณฑ์ทำได้ยาก ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไม่ได้มาตรฐาน นอกจากนี้เอนไซม์มีราคาแพง การใช้เอนไซม์ไลเปสเพียงครั้งเดียวทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง การตรึงเอนไซม์เป็นการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นเหล่านี้ เพราะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพและความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยา สามารถแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่าย สามารถนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงนั้นกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง สะดวกในการใช้งาน นำไปใช้ในปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องได้ง่าย และลดต้นทุนการผลิต แต่อย่างไรก็ตามการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสอาจทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงได้

เนื่องจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป ปัญหาเรื่องการปนเปื้อนจากตัวพุง หรือ ตัวพุงอาจทำปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Balcao *et al.*, 1996) การนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป ไปใช้ประโยชน์มีจุดมุ่งหมายเพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆ เช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์ไลเปส อีสระ

การตรึงเอนไซม์ คือ การทำให้เอนไซม์อยู่ในขอบเขตที่จำกัด อาจใช้การเชื่อมกับวัสดุหรือ สารที่ใช้ยึดเกาะ โดยที่เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมอยู่

ตัวพุงสำหรับการตรึงเอนไซม์

องค์ประกอบสำคัญในการตรึงเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์ ตัวพุง และกลไกหรือวิธีในการทำให้ เอนไซม์จับกับตัวพุง ซึ่งตัวพุงแต่ละชนิดจะเหมาะสมกับวิธีการตรึงที่แตกต่างกันออกไป ตัวพุง ที่ดีควรมีพื้นที่ผิวสำหรับการยึดเกาะของเอนไซม์มาก มีคุณสมบัติในการคัดเลือกการซึมผ่านของ สาร มีลักษณะชอบน้ำแต่ไม่ละลายในน้ำ มีความคงตัวต่อสารเคมี แรงกล และความร้อน มีความ แข็งแรง มีขนาดและรูปร่างที่เหมาะสม ป้องกันการทำลายจากจุลินทรีย์ได้ และสามารถนำกลับมา ใช้ใหม่ได้ (Kennedy and Cabral, 1987)

Kennedy และ Cabral (1987) แบ่งตัวพุงตามลักษณะรูปร่างได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีรู พุน (porous) และกลุ่มที่ไม่มีรูพุน (non-porous) และสามารถแบ่งตามลักษณะทางเคมีได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นสารอินทรีย์ (organic carriers) เช่น cellulose, starch, dextran, carrageenan, chitin, chitosan, silk, gelatin, albumin, polyamides และ polyacylamide เป็นต้น และกลุ่มที่เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic carriers) เช่น attapulgite clays, bentonite, kieselgur, pumic stone, non-porous glass และ metals เป็นต้น นอกจากนี้หมู่ต่างๆ บนตัวพุง มีผลต่อการยึดเกาะและกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งหมู่บางชนิด บนตัวพุงมีความไวในการทำปฏิกิริยากับบริเวณเร่งของเอนไซม์มีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ได้ ตัวอย่างหมู่ต่างๆ บนตัวพุง ได้แก่ หมู่ไดอะโซเนียม (diazonium group, $-N^+=N$) หมู่ไอโซไซยาเนท (isocyanate group, $-N-CO$) หมู่แฮโลไนด์ (active halide group, $-Br, -I, -F, -Cl$) หมู่แอมิโน (active amino group, $-NH_2$) หมู่คาร์บอกซิล (ative carboxyl group, $-COOH$) หมู่ไดซัลไฟด์ (active disulfide group, $-S-S$) หมู่อัลดีไฮด์ (active aldehyde group, $-CHO$)

Kennedy และ Cabral (1987) แบ่งวิธีการตรึงเอนไซม์เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ การตรึงเอนไซม์ ให้อยู่ในรูปของแข็งที่ไม่ละลาย และการตรึงให้อยู่ในรูปที่เป็นสารละลาย โดยการตรึงให้อยู่ในรูปที่

ไม่ละลายแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ การตรึงแบบยึดจับและการตรึงแบบห่อหุ้ม (ภาพที่ 8) การตรึงแบบยึดจับโดยเฉพาะวิธียึดเกาะกับตัวพุง เป็นวิธีที่นิยมใช้สำหรับตรึงเอนไซม์ไลเปส แบ่งออกเป็น 4 แบบ คือ

-วิธีดูดซับทางกายภาพ (physical-adsorption method) เป็นการยึดจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน แรงแวนเดอร์วาลส์ และแรงไฮโดรโฟบิก ซึ่งยึดระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับผิวของตัวพุงที่เป็นของแข็ง

-วิธียึดจับด้วยอิกอนิก (ionic-binding method) เป็นการตรึงเอนไซม์ด้วยแรงดึงดูดประจุของเอนไซม์กับตัวพุงที่มีส่วนของโมเลกุลที่สามารถแลกเปลี่ยนอิกอนได้ ทำให้เกิดเป็นพันธะอิกอนิกขึ้น

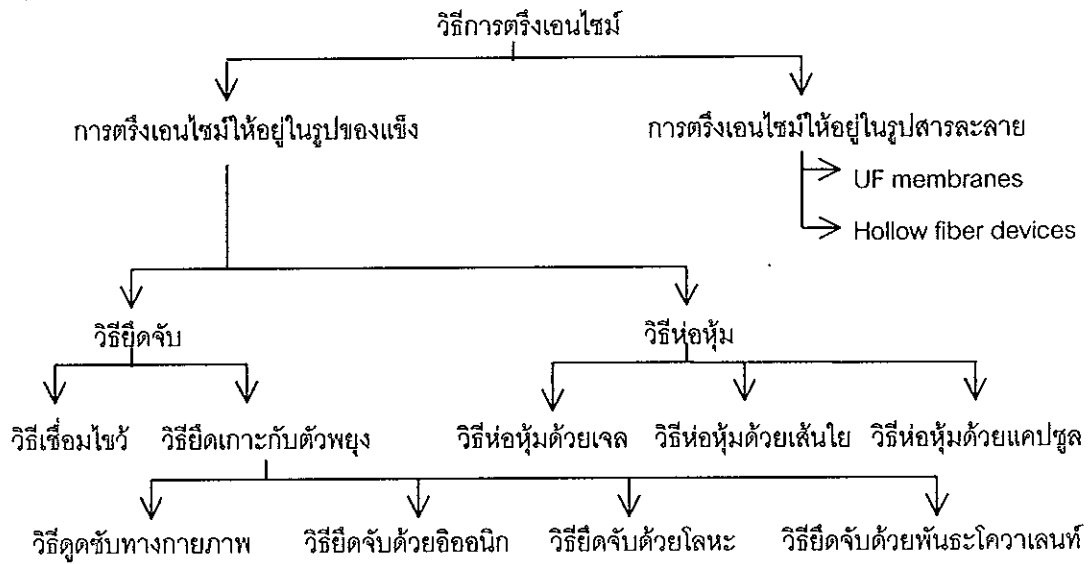
-วิธียึดจับด้วยโลหะ (metal-binding method) เป็นการตรึงโดยอาศัยโลหะทรานซิชัน ซึ่งส่วนมากเป็นเกลือของโททาเนียม และเซโคเนียม เนื่องจากออกไซด์ของโลหะเหล่านี้ไม่เป็นพิษ หลักการตรึงมี 2 ขั้นตอน คือ กระตุ้นให้เกิดการจับกันระหว่างโลหะทรานซิชันกับตัวพุง และการนำตัวพุงที่มีลิแกนด์ของโลหะทรานซิชันที่ได้จับกับโมเลกุลของเอนไซม์

-วิธียึดจับด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent-binding method) เป็นการตรึงเอนไซม์โดยอาศัยการเชื่อมโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวพุงด้วยพันธะโควาเลนต์ วิธีนี้ทำได้ยากเนื่องจากปฏิกิริยามีความซับซ้อน แต่การเชื่อมพันธะมีความแข็งแรงสูง ทำให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวพุงได้ยาก

การคัดเลือกตัวพุงสำหรับตรึงเอนไซม์เพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยาเคมีของไขมันและน้ำมัน นอกจากจะพิจารณาที่กิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปแล้ว ยังต้องพิจารณาถึงความเหมาะสมในการนำไปใช้ คือ ความเหมาะสมในด้านราคา ถังปฏิกรณ์ และความเสถียรของเอนไซม์ตรึงรูปต่อสภาวะแวดล้อมในปฏิกิริยา เช่น อุณหภูมิ พีเอช และสารตัวกลางในปฏิกิริยา เป็นต้น

Kimura และคณะ (1983 อ้างโดย Ruckenstein and Wang , 1993) ตรึงเอนไซม์ไลเปสบนตัวพุงหลายชนิดทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ พบว่าการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนตัวพุงหลายชนิดที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ เช่น โพลีโพรไพลีน (polypropylene), เซลการ์ด 2500 (Celgard 2500) จะให้กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันมะกอกสูงที่สุด

Brady และคณะ (1988) คัดเลือกตัวพุงที่เหมาะสมสำหรับตรึงเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ ซีไลท์ (celite), เซลลูโลส (cellulose), เอทิลเซลลูโลส (ethyl cellulose), คีเซลกูร์ (Kieselguhr), เคลย์ (clay), อะลูมินา (alumina), ซีพีจี 100 (CPG-100), คาร์บอน (carbon), แอคคูเรล (Accurel), เซลการ์ด 2500, โปรฟาคพีพี (Profax PP), ไมโครทีนเฮดพีอี (Microthene HDPE) และอื่นๆ พบ



ภาพที่ 8 การจำแนกวิธีการตรึงเอนไซม์ตามวิธีของ Kennedy และ Cabral

ที่มา : Kennedy และ Cabral (1987)

ว่าการใช้ตัวพองทุกชนิดในการตรึงเอนไซม์จะให้กิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ลดลง โดยตัวพองที่ให้กิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด คือ แอคคูเรล และเซลการ์ต 2500

Bosley และ Peilow (1997) กล่าวว่าโพลีโพรไพลีนเป็นตัวพองที่นิยมใช้กันมากในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากโพลีโพรไพลีนมีคุณสมบัติของการเป็นตัวพองที่ครบถ้วน เช่น มีรูพรุนมากทำให้มีเนื้อที่สำหรับการยึดเกาะมาก ไม่ชอบน้ำ มีความคงตัวและแข็งแรง สามารถแยกจากปฏิกิริยาและนำกลับมาใช้ใหม่ได้ นอกจากนี้ราคาไม่แพงด้วย โดยมีการวิจัยมากมายที่ใช้โพลีโพรไพลีนเป็นตัวพองสำหรับตรึงเอนไซม์ไลเปส เช่น Virto และคณะ (1994) ใช้โพลีโพรไพลีนตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันสัตว์ Baillie และคณะ (1995) ใช้โพลีโพรไพลีนตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน

วุฒิชัย พิชัยยุทธ์ (2540) ตรึงเอนไซม์ไลเปส OF จากเชื้อ *Candida rugosa* บนตัวพอง 4 ชนิด คือ แอคคูเรล ซีไลท์ ซิลิกาเจล และผงถ่าน พบว่าเอนไซม์ไลเปส OF ที่ตรึงบนแอคคูเรลมีกิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับร้อยละ 89 โดยมีกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มเท่ากับ 11,860 ยูนิตต่อกรัมตัวพอง

6. การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFA ในน้ำมันปลาโดยใช้เอนไซม์ไลเปส

จากประโยชน์ต่างๆ ของการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในการเร่งปฏิกิริยา ทำให้ในปัจจุบันมีการศึกษากันมากถึงการให้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลา ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

6.1 การใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย ω -3 PUFAs ออกจากโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันปลา ทำให้ ω -3 PUFAs เข้มข้นอยู่ในรูปของกรดไขมันอิสระ แล้วอาจนำ ω -3 PUFAs ในรูปกรดไขมันอิสระที่ได้มาทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันกับแอลกอฮอล์เพื่อทำให้ ω -3 PUFAs มีความเข้มข้นขึ้นอีก

Shimada และคณะ (1997a) เพิ่มความเข้มข้นของ DHA จากน้ำมันปลาทูน่าให้อยู่ในรูปของกรดไขมันอิสระ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยา 2 ปฏิกิริยา คือ ใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas sp.* (ไลเปส AK) เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่า พบว่าในส่วนของกรดไขมันอิสระที่ได้จากปฏิกิริยามีปริมาณ DHA เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 24.2 หลังจากนั้นใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus delemar* เร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดไขมันอิสระที่ได้กับลอริลแอลกอฮอล์ (lauryl alcohol) พบว่า DHA ไม่ถูกเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยลอริลแอลกอฮอล์ ทำให้ DHA มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น ร้อยละ 71.6 และเมื่อสกัดเอา DHA ที่ยังไม่ถูกเอสเทอร์ฟิเคชันกลับ

มาทำปฏิกิริยาซ้ำอีกภายใต้สภาวะปฏิกิริยาเดิม พบว่าความเข้มข้นของ DHA เพิ่มขึ้นสูงถึงร้อยละ 90.6

Shimada และคณะ (1997c) ใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus delemar* ที่ถูกตรึงบนตัวพองที่เป็นเซรามิก (ceramic) เร่งปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีสระหว่างกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปลาทูน่ากับแอลกอฮอล์ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ DHA ในรูปที่เป็นกรดไขมันอิสระ เมื่อทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 50 ชั่วโมง สามารถเพิ่มปริมาณของ DHA เป็นร้อยละ 52 จากเดิมที่มีปริมาณของ DHA เพียงร้อยละ 22.7 และเมื่อศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในการนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำ โดยมีการแทนที่ส่วนผสมปฏิกิริยาใหม่ทุก 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปนี้กลับมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีสซ้ำได้ถึง 47 ครั้ง โดยที่ปริมาณการเกิดปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีสลดลงเพียงร้อยละ 15 เท่านั้น และปริมาณ DHA ลดลงเล็กน้อย

6.2 การใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสเพื่อย่อยสลายกรดไขมันชนิดอื่นที่ไม่ใช่ ω -3 PUFAs ออกจากโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันปลา ทำให้ ω -3 PUFAs เข้มข้นอยู่ในรูปของกลีเซอไรด์

Shimada และคณะ (1994) ใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Geotrichum candidum* และ *Candida cylindracea* เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในรูปของกลีเซอไรด์ พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *G. candidum* สามารถผลิตปริมาณกลีเซอไรด์ได้สูงกว่าเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *C. cylindracea* แต่ได้ปริมาณของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกลีเซอไรด์ต่ำกว่า ซึ่งเมื่อคิดเป็น % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกลีเซอไรด์ พบว่าค่าที่ได้จากการใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *G. candidum* (ร้อยละ 84.2) สูงกว่าเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *C. cylindracea* (ร้อยละ 70.0) แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *G. candidum* มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกลีเซอไรด์ได้สูงกว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *C. cylindracea*

Moore และ McNeill (1996) ใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* เร่งปฏิกิริยาของน้ำมันปลาเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกลีเซอไรด์ ซึ่งพบว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* สามารถทำให้ DHA มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในส่วนของกลีเซอไรด์ แต่ EPA มีความเข้มข้นลดลง แสดงว่า EPA เข้มข้นในส่วนของกรดไขมันอิสระมากกว่า โดยในส่วนของกลีเซอไรด์มีปริมาณ DHA ถึงร้อยละ 40 ส่วน EPA มีปริมาณลดลง (ร้อยละ 7) จากปริมาณเริ่มต้น ซึ่งมีเท่ากับร้อยละ 13 และ 16

6.3 การใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน หรือปฏิกิริยาการย้ายกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันปลา เช่น ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีส ทำให้กรดไขมันที่ไม่ใช่ ω -3 PUFAs ที่อยู่บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันปลามาจับกับโมเลกุลแอลกอฮอล์แทน ทำให้ ω -3 PUFAs มีความเข้มข้นอยู่ในรูปของกลีเซอไรด์ หรือปฏิกิริยาอะซิโดไลซีส ซึ่งทำให้ ω -3 PUFAs เข้าไปจับกับโมเลกุลของน้ำมันแทนกรดไขมันอื่นๆ

Haraldsson และคณะ (1997) ใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas sp.* (PSL) เร่งปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีสเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ EPA และ DHA ในน้ำมันปลา โดยควบคุมสภาวะในการเกิดปฏิกิริยาให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ไลเปส PSL มีความจำเพาะในการทำกิจกรรมต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มี 1 พันธะคู่ สูงกว่า EPA และ DHA ทำให้กรดไขมันเหล่านั้นถูกย้ายออกจากโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันออกไปจับกับโมเลกุลของเอทานอลแทน ทำให้ EPA และ DHA ในส่วนของกลีเซอไรด์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 24 เป็นร้อยละ 50

Adachi และคณะ (1993) ใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas sp.* เร่งปฏิกิริยาอะซิโดไลซีสระหว่างน้ำมันปลาชาติติดกับกรดไขมันอิสระที่มีปริมาณ EPA และ DHA สูง เพื่อเร่งปฏิกิริยาให้ EPA และ DHA เข้าไปเอสเทอริฟายด์กับโมเลกุลน้ำมันแทนกรดไขมันอื่นๆ ทำให้ EPA และ DHA มีความเข้มข้นขึ้นในส่วนของกลีเซอไรด์ โดยพบว่าในสภาวะที่เหมาะสม สามารถเพิ่มความเข้มข้นของ EPA และ DHA ในส่วนของกลีเซอไรด์ได้ถึงร้อยละ 65 จากปริมาณเริ่มต้นในน้ำมันปลา (ร้อยละ 26)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs โดยเอนไซม์ไลเปส

การใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลา มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ชนิดของเอนไซม์ไลเปส ปริมาณของเอนไซม์ไลเปส ชนิดของแอลกอฮอล์ สัดส่วนของน้ำมันปลาต่อแอลกอฮอล์ ปริมาณน้ำ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา

1. ชนิดของเอนไซม์ไลเปส โดยเอนไซม์ไลเปสแต่ละชนิดมีผลต่อการเพิ่มปริมาณ ω -3 PUFAs ในรูปแบบและปริมาณที่ต่างกัน เนื่องจากมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันและตำแหน่งของกรดไขมันบนโมเลกุลน้ำมันต่างกัน

Shimada และคณะ (1995) คัดเลือกเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 3 ชนิด ซึ่งมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันและตำแหน่งของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ต่างกัน

เพื่อใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกลีเซอไรด์รวม พบว่าเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อ *Geotrichum candidum* ซึ่งมีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ทำให้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสย่อยสลายกรดไขมันอื่นๆ ที่ไม่ใช่ ω -3 PUFAs ออกจากโมเลกุลน้ำมันปลาได้สูงสุด ทำให้ ω -3 PUFAs มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในส่วนของกลีเซอไรด์ เท่ากับร้อยละ 48.7 และเมื่อทำปฏิกิริยาซ้ำทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 57.5 คิดเป็น % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกลีเซอไรด์เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาที่เริ่มต้น เท่ากับร้อยละ 81.5

Haraldsson และคณะ (1997) คัดเลือกเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 17 ชนิด เพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิสรหว่างน้ำมันปลาชาติกับเอทานอล พบว่าเอนไซม์ไลเปส PSL (*Pseudomonas sp.*) มีความจำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลน้ำมันปลาสูงสุด มีผลในการเร่งการย้ายกรดไขมันที่ไม่ใช่ ω -3 PUFAs ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ไปจับกับแอลกอฮอล์แทน ทำให้ ω -3 PUFAs มีความเข้มข้นในส่วนของกลีเซอไรด์รวมเพิ่มขึ้นสูงสุด เท่ากับร้อยละ 50

Shimada และคณะ (1997a) คัดเลือกเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 7 ชนิด ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปลาทูน่า เพื่อย่อยสลาย DHA ออกจากโมเลกุลของน้ำมันปลาทำให้ DHA มีความเข้มข้นในรูปของกรดไขมันอิสระ พบว่าเอนไซม์ไลเปส AK สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้สูงสุด เท่ากับร้อยละ 68.4 ความเข้มข้นของ DHA ในรูปกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 24.2 คิดเป็น % recovery ของ DHA ในส่วนของกรดไขมันอิสระ เท่ากับร้อยละ 72.9

2. ปริมาณเอนไซม์ไลเปส

Shimada และคณะ (1997a) ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปส AK ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ DHA ให้อยู่ในรูปของกรดไขมันอิสระ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ในระดับที่ต่างกันตั้งแต่ 0-700 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสมของปฏิกิริยา พบว่าปริมาณเอนไซม์ประมาณ 120 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากกว่านี้ระดับการเกิดปฏิกิริยาไม่เพิ่มขึ้น

Shimada และคณะ (1997b) ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus delemar* ในการเร่งปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิสรหว่างกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปลาทูน่า (tuna-FFA) กับลอรอลแอลกอฮอล์ ใช้ปริมาณเอนไซม์ต่างๆ กัน ตั้งแต่ 0-1,200 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม พบว่าระดับการเกิดปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิสและปริมาณของ DHA ในส่วนของกรด

ไขมันอิสระจะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ โดยปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม คือ 200 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม

3. ชนิดของแอลกอฮอล์

Shimada และคณะ (1997b) ศึกษาผลของชนิดของแอลกอฮอล์ในการเกิดปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีสระหว่างกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปลาทูนากับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เมทานอล (methanol) เอทานอล (ethanol) โพรพานอล (propanol) บิวทานอล (butanol) เพนทานอล (pentanol) เฮกซานอล (hexanol) ออกทานอล (octanol) เดคานอล (decanol) ลอริลแอลกอฮอล์ (lauryl alcohol) โอลีลแอลกอฮอล์ (oleyl alcohol) และกลีเซอรอล (glycerol) ด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus delemar* พบว่าแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มความเข้มข้นของ DHA คือ ลอริลแอลกอฮอล์ รองลงมา คือ เดคานอลและออกทานอล ตามลำดับ

4. สัดส่วนของน้ำมันปลาต่อแอลกอฮอล์

Shimada และคณะ (1997b) ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus delemar* ในการเร่งปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีสระหว่างกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปลาทูนากับลอริลแอลกอฮอล์ โดยใช้สัดส่วนของลอริลแอลกอฮอล์ต่อปริมาณกรดไขมันต่างกัน ตั้งแต่ 1:1 จนถึง 6:1 พบว่าสัดส่วนของลอริลแอลกอฮอล์ต่อปริมาณกรดไขมันที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณ DHA สูงสุด คือ 2:1 โมลต่อโมล โดยได้ปริมาณของ DHA ในส่วนกรดไขมันอิสระ เท่ากับร้อยละ 70.6

5. ปริมาณน้ำ

Shimada และคณะ (1997a) ศึกษาผลของปริมาณน้ำในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ไลเปส AK ในการเร่งปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ DHA ให้อยู่ในรูปของกรดไขมันอิสระ โดยเติมน้ำลงในปฏิกิริยาในปริมาณที่ต่างๆ กันตั้งแต่ร้อยละ 20-90 พบว่าปริมาณน้ำในปฏิกิริยาร้อยละ 50 ทำให้ปริมาณการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และ % recovery ของ DHA ในส่วนกรดไขมันอิสระสูงสุด

Shimada และคณะ (1997b) ศึกษาผลของปริมาณน้ำตั้งแต่ร้อยละ 5-60 ในปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีสระหว่างกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปลาทูนากับลอริลแอลกอฮอล์ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus delemar* ในการเร่งปฏิกิริยา พบว่าปริมาณน้ำร้อยละ 20 ทำให้เกิดปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีส และได้ปริมาณ DHA ในส่วนกรดไขมันอิสระสูงสุด

6. อุณหภูมิ

Shimada และคณะ (1997a) ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ไลเปส AK ในการเร่งปฏิกิริยา เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ DHA ในรูปของกรดไขมันอิสระ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปส AK คือ 40 องศาเซลเซียส

Shimada และคณะ (1997b) ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาแอลกอฮอล์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปลาทูน่ากับลอรอลแอลกอฮอล์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus delemar* ในการเร่งปฏิกิริยา พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus delemar* อยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดปฏิกิริยาแอลกอฮอล์เอสเทอริฟิเคชันได้ดี และปริมาณ DHA ในส่วนกรดไขมันอิสระมีค่าสูงสุด

7. ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา

Shimada และคณะ (1997a) ศึกษาผลของระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ไลเปส AK พบว่าปริมาณการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และ% recovery ของ DHA ในส่วนกรดไขมันอิสระจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 10 ชั่วโมงแรกของการทำปฏิกิริยา หลังจากนั้นปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และให้ค่าสูงสุดเมื่อทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Shimada และคณะ (1997b) ศึกษาผลของระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาแอลกอฮอล์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปลาทูน่ากับลอรอลแอลกอฮอล์ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus delemar* ในการเร่งปฏิกิริยา พบว่าการเกิดปฏิกิริยาแอลกอฮอล์เอสเทอริฟิเคชัน และปริมาณ DHA ในส่วนกรดไขมันอิสระ จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรกของการทำปฏิกิริยา หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนเริ่มคงที่ที่ประมาณชั่วโมงที่ 20 นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ DHA ที่ได้จะลดลงเรื่อยๆ เมื่อใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยานานขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ไลเปสตรังรูปและสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาคุณภาพสูง
2. เพื่อศึกษาจำนวนครั้งของการใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปซ้ำในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาคุณภาพสูง

ขอบเขตการวิจัย

1. ทำบริสุทธิ์น้ำมันปลาคุณภาพดีที่ได้จากการบีบอัดส่วนหัวของปลาคุณภาพดี ศึกษาองค์ประกอบของกลีเซอไรด์และองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลาคุณภาพบริสุทธิ์ที่ได้
2. คัดเลือกตัวพียงที่เหมาะสมสำหรับตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาคุณภาพสูง
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาคุณภาพสูง
4. ศึกษาการนำเอนไซม์ไลเปสตรังรูปกลับมาใช้ใหม่

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัตถุดิบ

น้ำมันปลาจากการบีบอัดส่วนหัวของปลาทูน่าได้รับความเชื่อเื้อ้เพื่อจาก บริษัทไซติวัฒน์ อุตสาหกรรมการผลิต จำกัด (มหาชน) อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

2. เอนไซม์ไลเปสทางการค้าชนิดผง

ไลเปส PS (*Pseudomonas sp.*) และไลเปส D (*Rhizopus delemar*) ได้รับความเชื่อเื้อ้เพื่อจากบริษัท Amano Seiyaku ประเทศญี่ปุ่น

ไลเปสตรังรูป Lipozyme® IM (*Mucor miehei*) ซื้อจากบริษัท Novo Nordisk A/S ประเทศเดนมาร์ค

3. ตัวพุงสำหรับตรังรูปเอนไซม์

แอคคูเรล (Accurel หรือ Polypropylene powder EP-100) ขนาดรูพรุนต่ำกว่า 200 ไมโครเมตร ได้รับความเชื่อเื้อ้เพื่อจากบริษัท Akzo Nobel ประเทศเยอรมันนี

ซีไลท์ (Celite 545) ขนาด 200 ไมโครเมตร ผลิตโดยบริษัท Wako Pure Chemical Industries ประเทศญี่ปุ่น

ซิลิกาเจล (Silica gel 60) ขนาด 200 ไมโครเมตร ผลิตโดยบริษัท Merck ประเทศเยอรมันนี

4. สารเคมี

สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade) ที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปส ปริมาณโปรตีน องค์ประกอบของน้ำมันปลาทูน่า องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่า

อุปกรณ์

เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 210S ยี่ห้อ Satorius ประเทศเยอรมันนี

เครื่องวัดพีเอช รุ่น 420A ยี่ห้อ Orion ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องกรองสูญญากาศ รุ่น A-3S ยี่ห้อ EYELA ประเทศญี่ปุ่น

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ รุ่น BE 500 ยี่ห้อ Memmert ประเทศเยอรมันนี

เครื่องเขย่าแบบตั้งโต๊ะ รุ่น 3005 ยี่ห้อ GFL ประเทศเยอรมันนี

Magnetic stirrer รุ่น RO 5 power ยี่ห้อ IKAMAG ประเทศสหรัฐอเมริกา

Spectrophotometer รุ่น U-2000 ยี่ห้อ Hitachi ประเทศญี่ปุ่น

Rotary evaporator รุ่น SB-651 ยี่ห้อ EYELA ประเทศญี่ปุ่น

Thin Layer Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FID) รุ่น latroscan MK-5 บริษัท latron Laboratories ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้ Chromarod SIII (silica gel powder coated)

Gas Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (GC/FID) รุ่น Autosystem XL-GC บริษัท PERKIN ELMER ประเทศเยอรมันนี โดยใช้คอลัมน์แบบ Fused silica capillary ที่มี DF 0.25 ไมโครเมตร ชนิด FFAP-PERMABOND ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ยาว 25 เมตร

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

โดยใช้วิธี Two-phase emulsion method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993)

1.1 สารผสมในปฏิกิริยา

สารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์มโอเลอินในไอโซออกเทนความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) 1.0 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ไลเปส (ละลายเอนไซม์ไลเปสชนิดผงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0) ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6.0 โมลาร์ 0.3 มิลลิลิตร บันผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วแล้วทิ้งไว้ให้แยกชั้น

1.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระ

วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระด้วยวิธี Cupric acetate method (Kwon and Rhee, 1986) โดยดูดสารละลายส่วนบนในปฏิกิริยาจากข้อ 1.1 มาเจือจางกับไอโซออกเทน ให้ได้ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วแล้วทิ้งให้แยกชั้น นำส่วนของไอโซออกเทนซึ่งอยู่ด้านบนไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร แล้ววัดปริมาณกรดไขมันที่ถูกปลดปล่อยออกมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปของกรดปาล์มิติก (ภาคผนวก ข)

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอินให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปกรดปาล์มิติกปริมาณ 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2. การวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสตรังรูป

การวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสตรังรูป ทำการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสอิสระ แต่ใช้เอนไซม์ตรังรูป 3-5 มิลลิกรัม แทนการใช้สารละลายเอนไซม์

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไลเปส

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไลเปส ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (Lowry *et al.*, 1951) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

4. การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของน้ำมันปลาทูน่า

การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของน้ำมันปลาทูน่าซึ่งได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ ด้วย TLC/FID analyzer สำหรับขั้นตอนและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย TLC/FID analyzer มีดังนี้

แช่ quartz rods (silica gel powder coated Chromarod S-III) ในสารละลายกรดบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 5 นาที นำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปสแกนด้วย TLC/FID analyzer หลังจากนั้นนำตัวอย่างน้ำมันปลาทูน่า (ละลายน้ำมันปลาทูน่าในคลอโรฟอร์มในปริมาณที่เหมาะสม) หยดบน

quartz rods ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ที่งไว้ให้แห้งประมาณ 5 นาที นำ quartz rods ไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วยเบนซีน : คลอโรฟอร์ม : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 50 : 20 : 0.7 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) (Shimada *et al*, 1997a) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 10 เซนติเมตร นำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์ภายใต้สภาวะที่มีอัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจน 160 มิลลิตรต่อนาที อัตราการไหลของอากาศ 2,000 มิลลิตรต่อนาที และเวลาที่ใช้ในการสแกนเท่ากับ 30 วินาทีต่อสแกน สแกนโดยระบบอัตโนมัติด้วย latroscan ซึ่งจะคำนวณปริมาณขององค์ประกอบแต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้ peak เปรียบเทียบกับ peak ทั้งหมด

5. การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่า

การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่า โดยการเตรียมน้ำมันปลาทูน่าให้อยู่ในรูปของเมทิลเอสเทอร์ (ภาคผนวก ข) แล้ววิเคราะห์ด้วย GC/FID analyzer สำหรับขั้นตอนและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย GC/FID analyzer มีดังนี้

เซ็ท GC/FID analyzer ที่มีคอลัมน์แบบ Fused silica capillary DF 0.25 ไมโครเมตร ชนิด PERMABOND-FFAP ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 25 เมตรให้มีสภาวะการทำงานดังนี้ อุณหภูมิของ injector เท่ากับ 245 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มจาก 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5 นาที เพิ่มขึ้นเป็น 170 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มเป็น 195 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที หลังจากนั้นเพิ่มเป็น 215 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงที่ที่ 215 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12.5 นาที และอุณหภูมิของ detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีอัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม 25 เซนติเมตรต่อนาที และ Split ratio เท่ากับ 100:1 (Shimada *et al*, 1997a) เมื่อ GC/FID analyzer พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ ฉีดสารละลายเมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันปลาทูน่า ปริมาตร 1-10 ไมโครลิตร ที่ injector port และสแกนด้วยระบบสแกนอัตโนมัติ ซึ่งจะคำนวณปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้ peak เปรียบเทียบกับ peak ทั้งหมด

วิธีการศึกษา

ในแต่ละขั้นตอนการศึกษา วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design:CRD) โดยกำหนดจำนวนซ้ำ (replication) ในการทดลองแต่ละครั้งเท่ากับ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยวิธี ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี

Duncan's new multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS for Window version 9.0

1. การทำบริสุทธิ์น้ำมันปลาทูน่าและศึกษาคุณสมบัติบางประการ

ทำบริสุทธิ์น้ำมันปลาทูน่าดิบที่ได้จากการบีบอัดส่วนหัวของปลาทูน่าพันธุ์ Skipjack โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากสมบัติ รุ่งศิลป์ (2541) (ภาคผนวก ก) วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันปลาทูน่าด้วย TLC/FID analyzer และวิเคราะห์ส่วนประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่าด้วย GC/FID analyzer

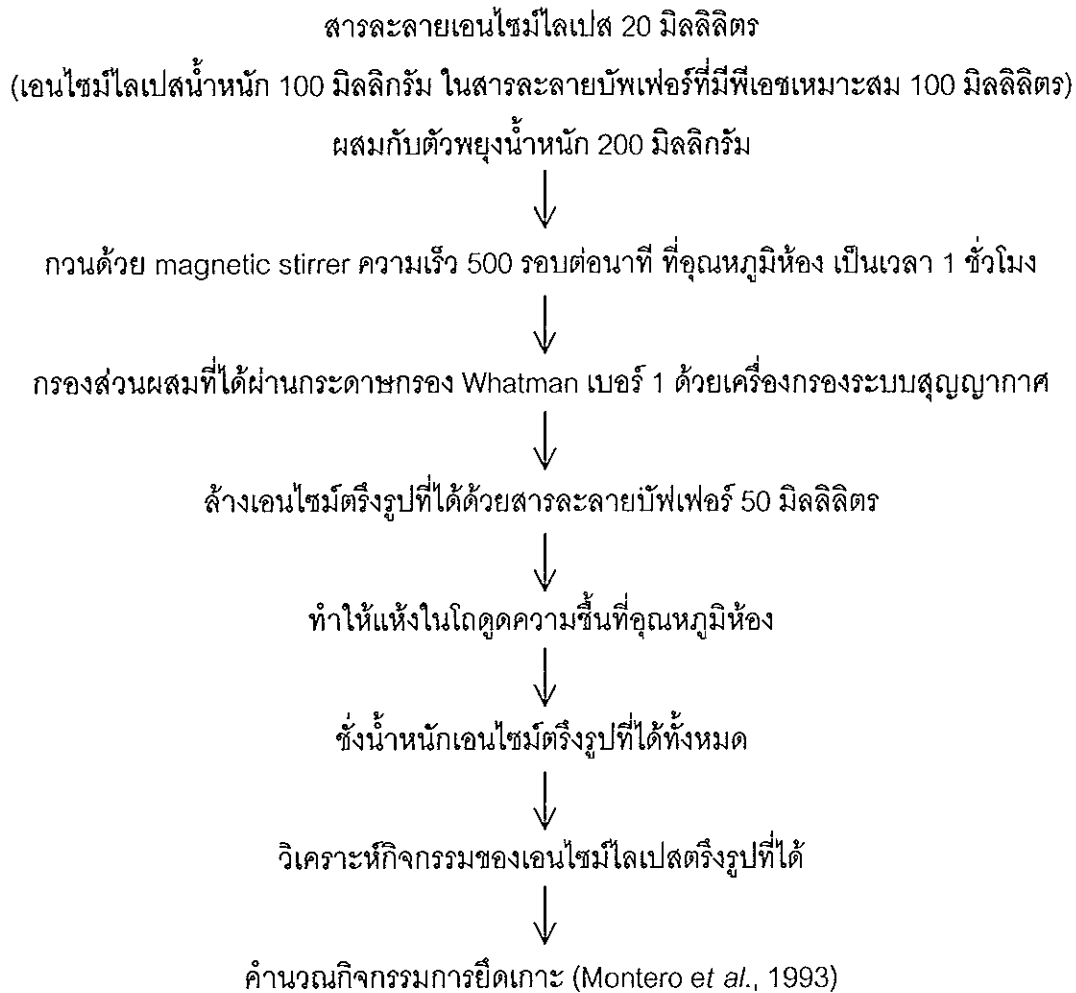
2. การตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีดูดซับบนตัวพอง

นำเอนไซม์ไลเปสมาตรึงบนตัวพองจำนวน 3 ชนิด คือ แอคคูเรล ซีไลท์ และซิลิกาเจล โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Montero และคณะ (1993) ดังภาพที่ 9 แล้วคัดเลือกตัวพองที่เหมาะสมต่อเอนไซม์แต่ละชนิดมา 1 ชนิด เพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยาเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs โดยใช้เกณฑ์ในการคัดเลือกดังนี้

2.1 คัดเลือกตัวพองที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปส PS เพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่าเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-PS โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงของ Shimada และคณะ (1997a) (ภาพที่ 10) การคัดเลือกพิจารณาจาก % recovery สูงสุดของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น

2.2 คัดเลือกตัวพองที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปส D เพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่าง FFA-PS กับลิวลีนแอลกอฮอล์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS ให้สูงขึ้น (เรียกผลิตภัณฑ์ที่ได้ว่า FFA-D) โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงของ Shimada และคณะ (1997b) (ภาพที่ 11) การคัดเลือกพิจารณาจากปริมาณของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D สูงสุด

2.3 คัดเลือกตัวพองที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปส D เพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่าเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ (MG-D) โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงของ Shimada และคณะ (1997a) (ภาพที่ 12) การคัดเลือกพิจารณาจาก % recovery สูงสุดของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น



$$\text{กิจกรรมการยึดเกาะ (ร้อยละ)} = \frac{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ไลเปสที่รูป} \times 100}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ไลเปสอิสระ}}$$

ภาพที่ 9 การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ
 ที่มา : ดัดแปลงจาก Montero และคณะ (1993)

3. การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูล่าด้วยเอนไซม์ไลเปส

การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูล่าโดยใช้เอนไซม์ไลเปสในการทดลองนี้ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 เพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอนย่อย คือ ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูล่าด้วยเอนไซม์ไลเปส PS เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ โดยเรียกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนนี้ว่า FFA-PS และทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่าง FFA-PS ที่ได้กับลิวซิโนลแอตทอสอลด้วยเอนไซม์ไลเปส D เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS ให้สูงมากขึ้น โดยเรียกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนนี้ว่า FFA-D

ขั้นตอนที่ 2 เพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ โดยการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูล่าด้วยเอนไซม์ไลเปส D เรียกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนนี้ว่า MG-D

ขั้นตอนที่ 3 เพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ให้อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ โดยการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดไขมันอิสระที่มี ω -3 PUFAs สูง (FFA-D) และโมโนกลีเซอไรด์ที่มี ω -3 PUFAs สูง (MG-D) ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปทางการค้า Lipozyme® IM

3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-PS

นำเอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูล่า โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงของ Shimada และคณะ (1997a) ดังภาพที่ 10 การคัดเลือกพิจารณาจาก % recovery สูงสุดของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูล่าเริ่มต้น และศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้

3.1.1 ปริมาณเอนไซม์

ทดลองใช้ปริมาณเอนไซม์ในปฏิกิริยาเป็น 10, 20, 30, 40, 50, 75 และ 100 ยูนิต ต่อกรัมส่วนผสม

3.1.2 ปริมาณน้ำ

ใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1.1 และเปลี่ยนการเติมปริมาณน้ำในปฏิกิริยาเป็น ร้อยละ 30, 40, 50, 60 และ 70 ของน้ำหนักส่วนผสม

3.1.3 อุณหภูมิ

ใช้ปริมาณแอนไซม์ตริงรูปตามข้อ 3.1.1 และเติมน้ำตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1.2 และเปลี่ยนอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเป็น 30, 35, 45, และ 55 องศาเซลเซียส

3.1.4 ระยะเวลา

ใช้สภาวะที่เหมาะสมตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1.1, 3.1.2 และ 3.1.3 แต่ใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 0, 6, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-D

นำแอนไซม์ไลเปส D ตริงรูปเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ลิเฟชันระหว่าง FFA-PS กับลอริลแอลกอฮอล์ โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงของ Shimada และคณะ (1997b) ดังภาพที่ 11 การคัดเลือกพิจารณาจากปริมาณของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D สูงสุด และศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้

3.2.1 ปริมาณแอนไซม์

ทดลองใช้ปริมาณแอนไซม์ในปฏิกิริยาเป็น 50, 75, 100, 200, 300, 400 และ 500 ยูนิต์ต่อกรัมส่วนผสม

3.2.2 ปริมาณน้ำ

ใช้ปริมาณแอนไซม์ตริงรูปตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1 และเปลี่ยนการเติมปริมาณน้ำในปฏิกิริยาเป็นร้อยละ 5, 10, 20, 30 และ 40 ของน้ำหนักส่วนผสม

3.2.3 อัตราส่วนของกรดไขมันอิสระกับแอลกอฮอล์

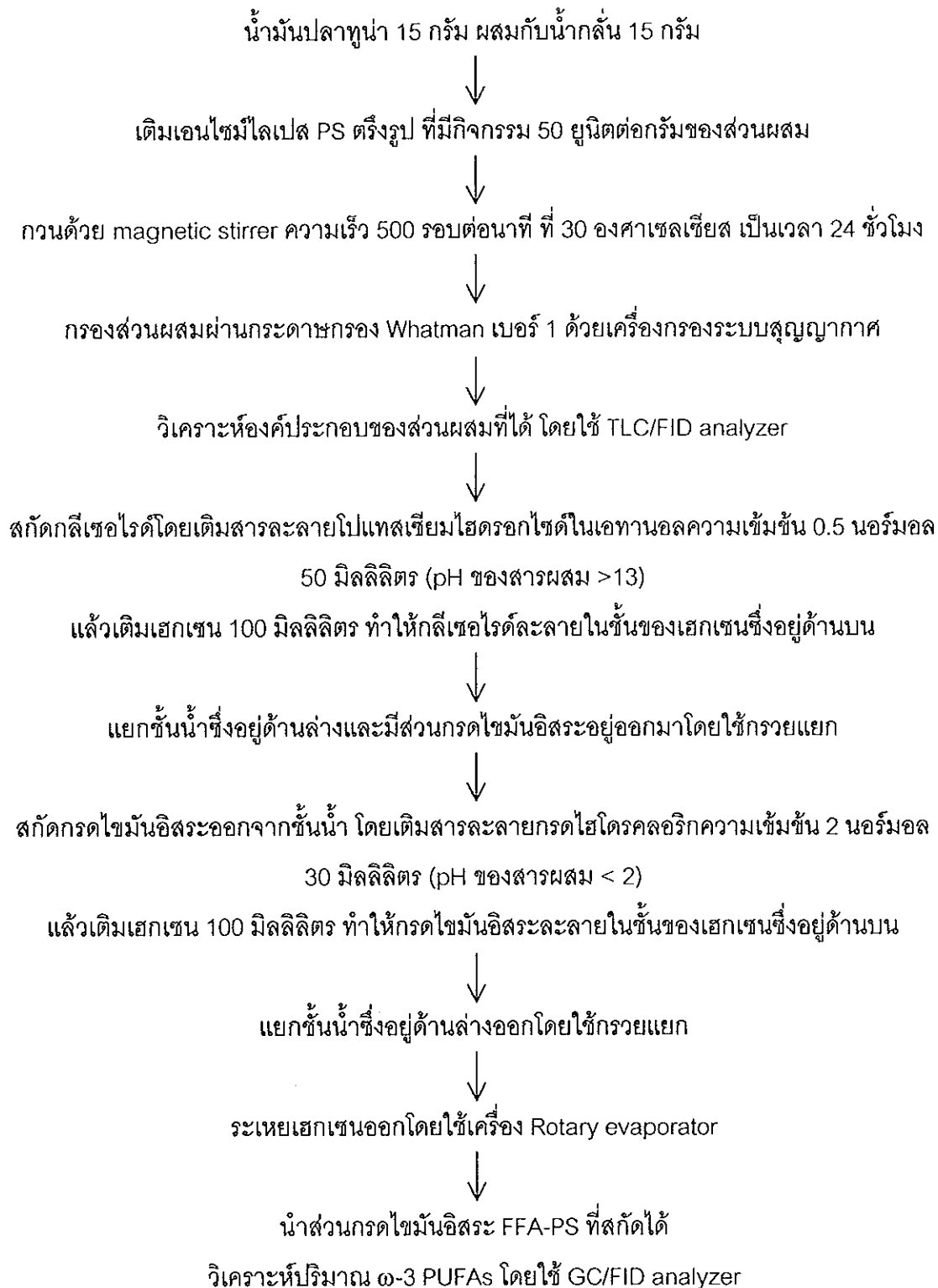
ใช้ปริมาณแอนไซม์ตริงรูปตามข้อ 3.2.1 และเติมน้ำตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.2 และเปลี่ยนอัตราส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-PS กับลอริลแอลกอฮอล์ในปฏิกิริยาเป็น 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 โมลต่อโมล

3.2.4 อุณหภูมิ

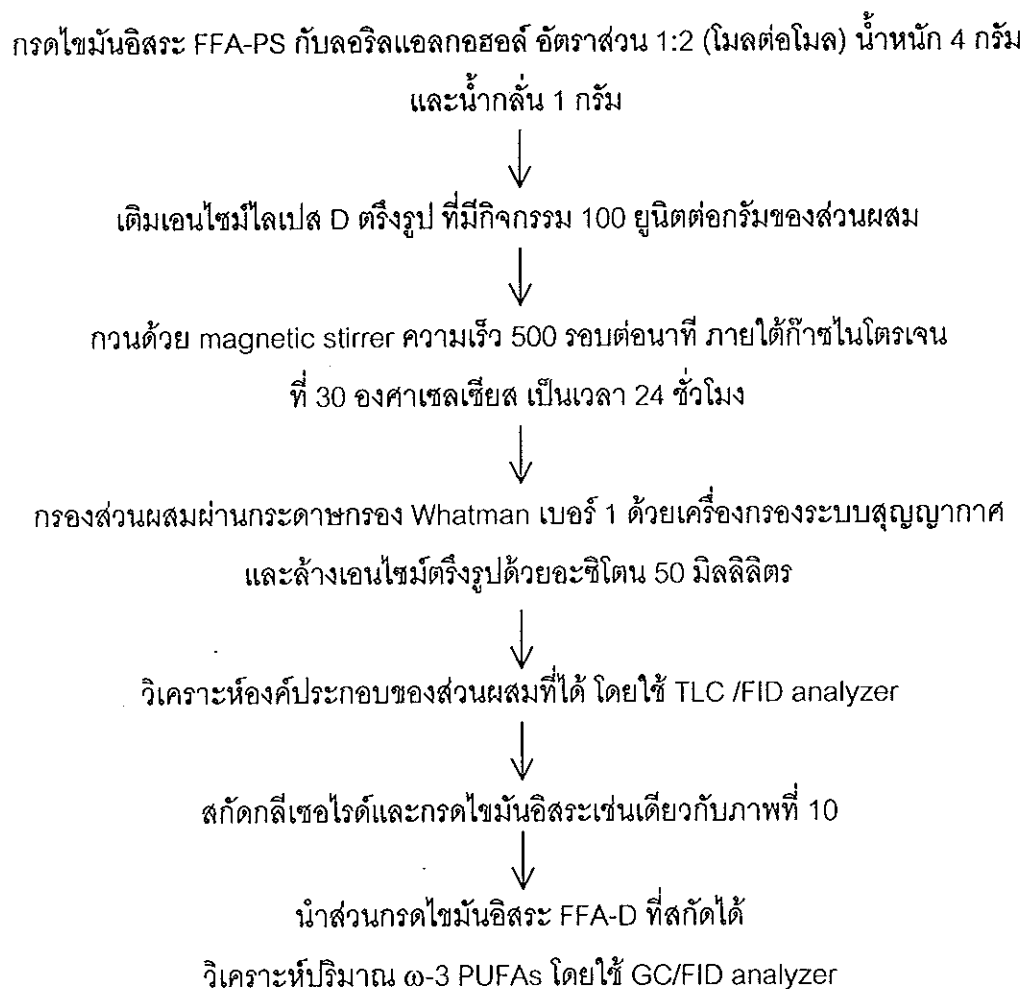
ใช้ปริมาณแอนไซม์ตริงรูปตามข้อ 3.2.1 ปริมาณน้ำตามข้อ 3.2.2 และอัตราส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-PS กับลอริลแอลกอฮอล์ตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.3 และเปลี่ยนอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเป็น 30, 35, 45, และ 55 องศาเซลเซียส

3.2.5 ระยะเวลา

ใช้สภาวะที่เหมาะสมตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1-3.2.4 แต่ใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 0, 6, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 10 ขั้นตอนการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-PS ที่มา : ดัดแปลงจาก Shimada และคณะ (1997a)



ภาพที่ 11 ขั้นตอนการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-D
ที่มา : ดัดแปลงจาก Shimada และคณะ (1997b)

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ MG-D

นำเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่า โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงของ Shimada และคณะ (1997a) ดังภาพที่ 12 การคัดเลือกพิจารณาจาก % recovery สูงสุดของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น และศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้

3.3.1 ปริมาณเอนไซม์

ทดลองใช้ปริมาณเอนไซม์ในปฏิกิริยาเป็น 10, 20, 30, 40, 50, 75 และ 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม

3.3.2 ปริมาณน้ำ

ใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.1 และเปลี่ยนการเติมปริมาณน้ำในปฏิกิริยาเป็นร้อยละ 30, 40, 50, 60 และ 70 ของน้ำหนักส่วนผสม

3.3.3 อุณหภูมิ

ใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปตามข้อ 3.3.1 และน้ำตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.2 และเปลี่ยนอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเป็น 30, 35, 40, และ 45 องศาเซลเซียส

3.3.4 ระยะเวลา

ใช้สภาวะที่เหมาะสมตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.1, 3.3.2 และ 3.3.3 แต่ใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 0, 6, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

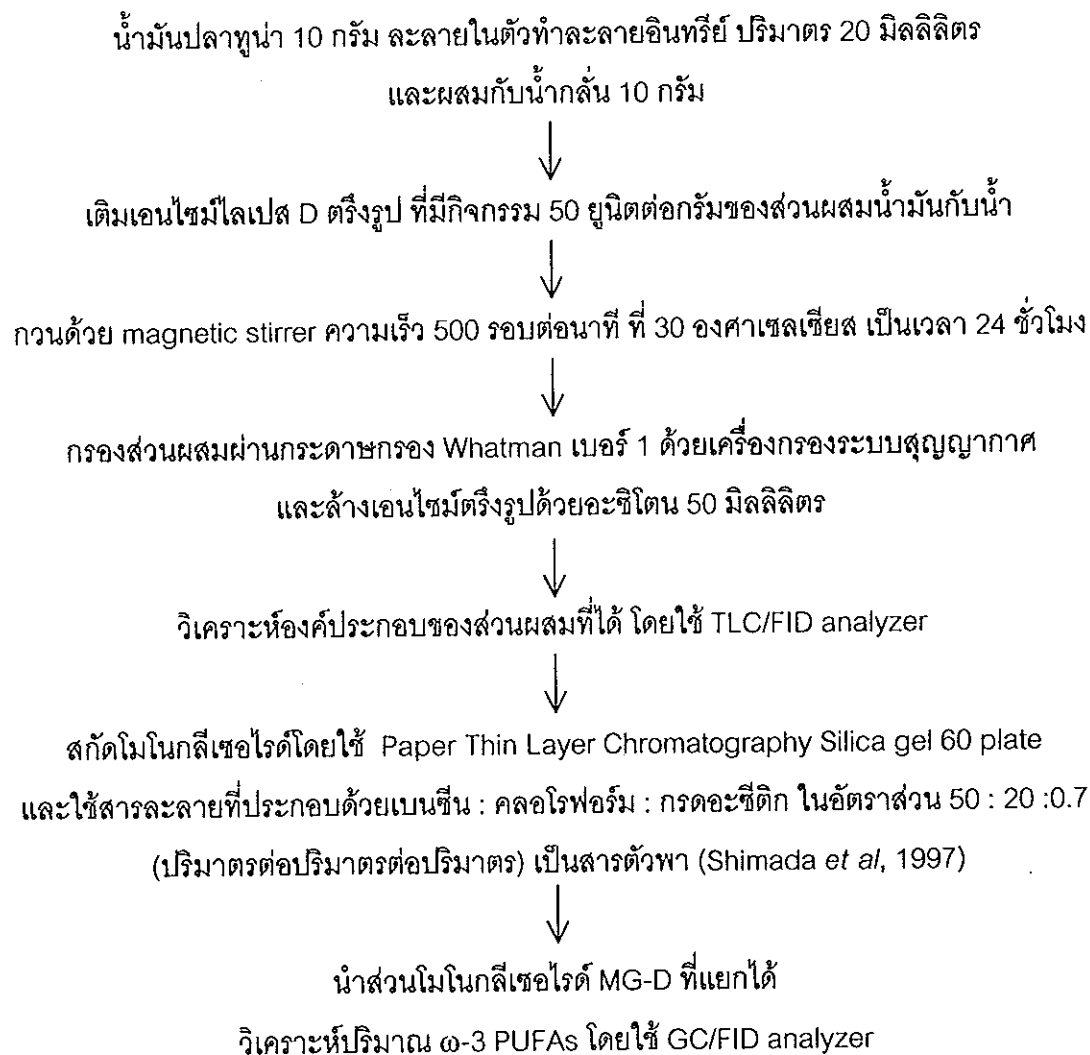
3.4 การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ให้อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์

นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Lipozyme® IM เร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดไขมันอิสระที่มีความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs สูง (FFA-D) กับโมโนกลีเซอไรด์ที่มีความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs สูง (MG-D) โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงของ Lee และ Akoh (1996) ดังภาพที่ 13

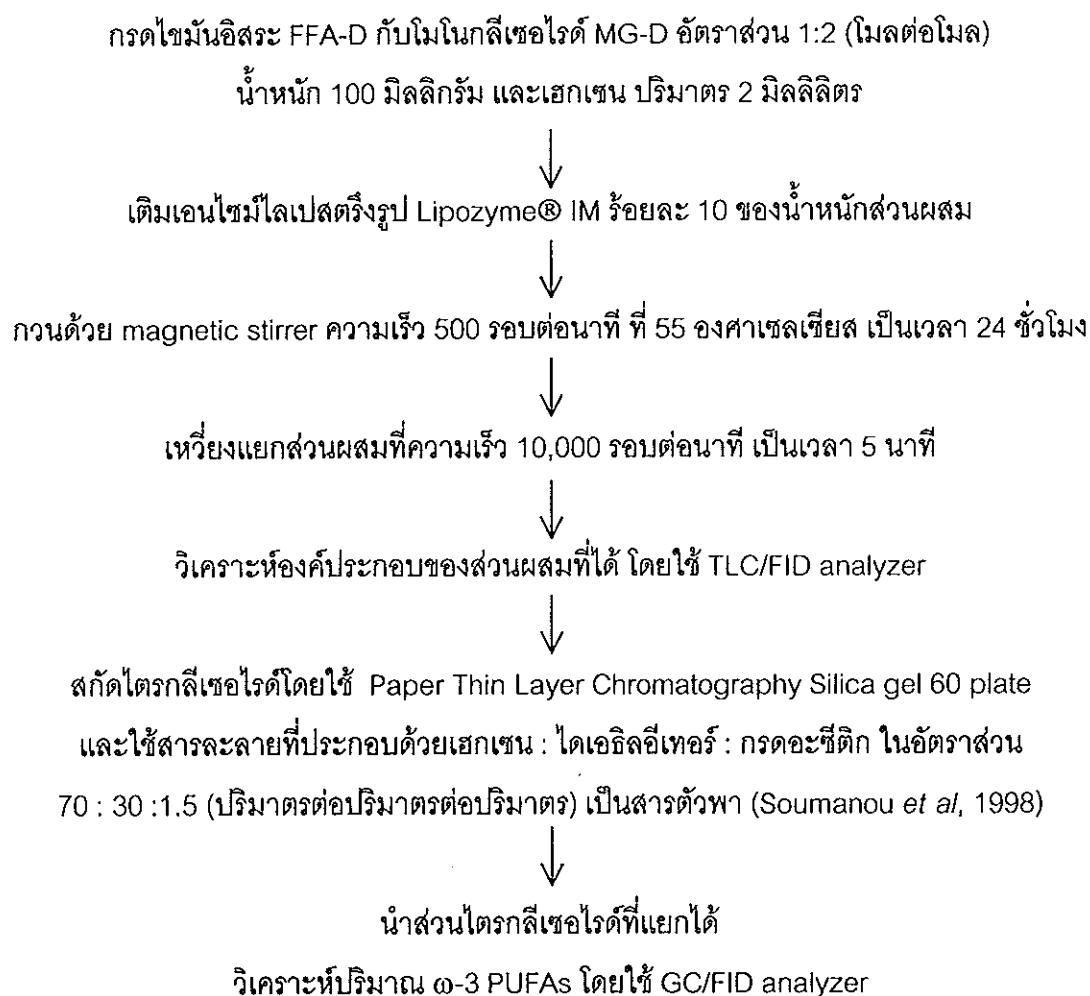
4. การใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปซ้ำ

นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแต่ละชนิดมาทำการเร่งปฏิกิริยาเดิมซ้ำ คือหลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาเก่า หยุดปฏิกิริยาโดยการแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกจากปฏิกิริยาเดิมโดยกรองส่วนผสมผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และล้างด้วยอะซิโตน 50 มิลลิลิตร เพื่อชะเอาส่วนของกรดไขมันและกลีเซอไรด์ที่ติดอยู่กับเอนไซม์ออกไป นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปไปทำให้แห้งในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาใน

แต่ละครั้ง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเร่งปฏิกิริยาในครั้งต่อไป (ใช้ยูนิตต่อกรัม
ของส่วนผสมเท่ากันในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง) ทำซ้ำจนกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงมากกว่า
ร้อยละ 50



ภาพที่ 12 ขั้นตอนการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ MG-D
ที่มา : ดัดแปลงจาก Shimada และคณะ (1997a)



ภาพที่ 13 ขั้นตอนการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ให้อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์
 ที่มา : ดัดแปลงจาก Lee และ Akoh (1996)

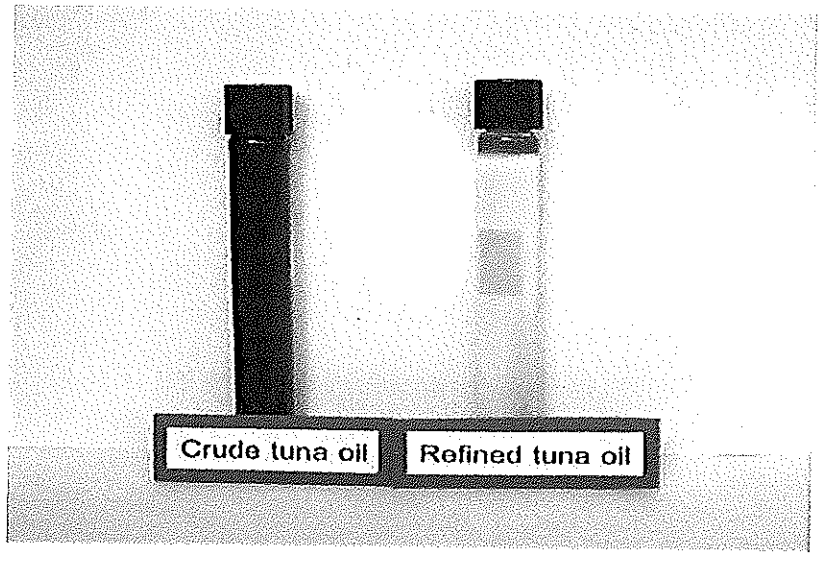
บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การทำบริสุทธิ์น้ำมันปลาทูน่าและศึกษาคุณสมบัติบางประการ

น้ำมันปลาดิบที่ได้จากการบีบอัดส่วนหัวของปลาทูน่าพันธุ์ Skipjack ของโรงงานโชติวัฒน์ อุตสาหกรรมการผลิต จำกัด มหาชน จังหวัดสงขลา มีลักษณะชั้นหนืด สีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นคาวจัด เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของสมบัติ รุ่งศิลป์ (2541) พบว่าน้ำมันปลาที่ได้มีลักษณะเหลว สีเหลืองใส มีกลิ่นคาว ลักษณะของน้ำมันปลาดิบและน้ำมันปลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แสดงดังภาพที่ 14 ในการประเมินผลผลิตที่ได้พบว่าเมื่อใช้น้ำมันปลาทูน่าดิบจำนวน 1.80 กิโลกรัม สามารถผลิตเป็นน้ำมันปลาทูน่าได้ 1 กิโลกรัม ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต เท่ากับร้อยละ 55.56 น้ำมันปลาทูน่าที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีค่า สaponification 185.10 ซึ่งคำนวณเป็นน้ำหนักโมเลกุลมีค่าประมาณ 909.42

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันปลาทูน่าที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ พบว่ามีองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ถึงร้อยละ 99 (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่าขั้นตอนการทำบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพสูงโดยสามารถกำจัดกรดไขมันอิสระและองค์ประกอบอื่นๆ ส่งผลให้สัดส่วนของไตรกลีเซอไรด์มีปริมาณสูงขึ้น นอกจากนี้การเก็บรักษาน้ำมันปลาที่ได้ภายใต้ก๊าซไนโตรเจนในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำช่วยป้องกันการเสื่อมเสียของน้ำมันปลาเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาออกไซด์ออกซิเดชันด้วย (Stansby, 1990) ทำให้น้ำมันปลาทูน่าที่ได้มีสภาพที่ดี เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน พบว่ามีองค์ประกอบหลักเป็นกรดปาล์มิติก กรดสเตียริก กรดโอเลอิก EPA และ DHA ร้อยละ 20.78, 6.58, 10.73, 6.42 และ 27.18 ขององค์ประกอบทั้งหมด ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ปริมาณ EPA และ DHA ที่ได้ใกล้เคียงกับผลการทดลองของ พรทิพย์ แซ่เตี๋ย (2537) ซึ่งสกัดน้ำมันจากหัวปลาทูน่าพันธุ์ Skipjack ที่ผ่านการนึ่งสุกด้วยวิธี wet reduction แล้วทำให้บริสุทธิ์ พบว่าน้ำมันปลาที่ได้มี EPA และ DHA เท่ากับร้อยละ 7.67 และ 26.56 ตามลำดับ โดยปริมาณ EPA และ DHA ที่ได้ต่ำกว่าในการทดลองของ Shimada และคณะ (1994) ที่ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่าที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ซึ่งมีค่าสaponification เท่ากับ 184 พบว่ามีปริมาณ EPA และ DHA สูงกว่า คือ ร้อยละ 8.2 และ 30.3 ตามลำดับ นอกจากนี้ สมบัติ รุ่งศิลป์ (2541) สกัดน้ำมันปลาทูน่าจากน้ำนิ่งปลาทูน่า และทำบริสุทธิ์ พบว่าในน้ำมันปลาทูน่าที่ได้มี EPA และ DHA อยู่ในช่วง ร้อยละ 4.4-6.7 และ 22.5-36.9 ตามลำดับ



ภาพที่ 14 ลักษณะของน้ำมันปลาทูนาดิบและน้ำมันปลาทูนาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของน้ำมันปลาทูน่า

องค์ประกอบของน้ำมันปลาทูน่า	ร้อยละ
ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride)	99.32
ไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride)	0.32
โมนोगลิเซอไรด์ (Monoglyceride)	0.00
กรดไขมันอิสระ (Free fatty acid)	0.36

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่า

องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่า	ร้อยละ
กรดไมริสติก (Myristic acid, C14:0)	4.02
กรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0)	20.78
กรดปาล์มิโตเลอิก (Palmitoleic acid, C16:1)	5.76
กรดสเตียริก (Stearic acid, C18:0)	6.58
กรดโอเลอิก (Oleic acid, C18:1)	10.73
กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2)	1.68
กรดอะราคิโดนิก (Arachidonic acid, C20:4)	1.84
กรดไอโคซะเพนตะอีนอิก (Eicosapentaenoic acid, EPA, C20:5)	6.42
กรดโดโคซะเฮกซะอีนอิก (Docosahexaenoic acid, DHA, C22:6)	27.18
กรดไขมันอื่นๆ	15.01

2. การตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส PS และ D ซึ่งเป็นเอนไซม์ไลเปสอิสระ เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลาย ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมจำเพาะ ได้ผลแสดงดังตารางที่ 6 พบว่าเอนไซม์ไลเปส PS มีค่ากิจกรรมการย่อยสลาย (ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์) โปรตีน (มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิกรัมเอนไซม์) และกิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) เท่ากับ 6.40, 0.07 และ 96.83 ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์ไลเปส D มีค่าสูงกว่า โดยมีค่าเท่ากับ 406.92, 1.10 และ 370.47 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปส D มีความบริสุทธิ์มากกว่าเอนไซม์ไลเปส PS และเมื่อผ่านการตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ ตามวิธีการที่ดัดแปลงของ Montero และคณะ (1993) โดยใช้ตัวพุง 3 ชนิด คือ แอคคูเรล ซีไลท์ และซิลิกาเจล ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7 จะเห็นว่าเมื่อใช้แอคคูเรลในการตรึงเอนไซม์ไลเปสทั้ง 2 ชนิด มีกิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึง เท่ากับ 0.94 และ 1.45 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป และมีกิจกรรมการยึดเกาะ เท่ากับร้อยละ 18.80 และ 3.56 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้ซีไลท์และซิลิกาเจลมาก ($p < 0.05$) อาจเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีความไม่ชอบน้ำสูงจึงสามารถจับกับตัวพุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic support) เช่น พอลิโพรพิลีน (polypropylene) ได้ดีกว่าตัวพุงที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic support) เช่น ซีไลท์ และ ซิลิกาเจล (Ruckenstein and Wang, 1993) ทำให้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนตัวพุงที่ไม่ชอบน้ำมีกิจกรรมสูงกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนตัวพุงที่ชอบน้ำ นอกจากนี้ตัวพุงที่ไม่ชอบน้ำทำให้น้ำมันที่ไม่ละลายน้ำสามารถสัมผัสกับเอนไซม์ไลเปสที่เกาะอยู่กับตัวพุงได้ในปริมาณที่มากกว่า (Malcata *et al.*, 1990; 1992) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Kimura และคณะ (1983 อ้างโดย Ruckenstein and Wang, 1993) ซึ่งตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสบนตัวพุงหลายชนิดทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ พบว่าการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนตัวพุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ให้กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันมะกอกสูงสุด นอกจากนี้ Brady และคณะ (1988) คัดเลือกตัวพุงที่เหมาะสมสำหรับตรึงเอนไซม์ไลเปส พบว่าการใช้ตัวพุงทุกชนิดในการตรึงให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง โดยตัวพุงที่ให้กิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด คือ แอคคูเรลและเซลการ์ดี 2500

จากการที่ซีไลท์และซิลิกาเจลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปต่ำเกินไป หากนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาจะทำให้สิ้นเปลืองเอนไซม์และตัวพุง และต้องใช้เอนไซม์ตรึงรูปปริมาณมากเพื่อให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์ตามที่ต้องการ ดังนั้นจึงคัดเลือกแอคคูเรลสำหรับใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปสทั้ง 2 ชนิด เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ส่วนเอนไซม์ไลเปส Lipozyme® IM เป็นเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปทางการค้า ซึ่งมีกิจกรรมการย่อยสลาย เท่ากับ 0.13 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป

ตารางที่ 6 กิจกรรม โปรตีน และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสทางการค้า

เอนไซม์ไลเปส ทางการค้า	กิจกรรม (ยูนิต/มก.เอนไซม์)	โปรตีน (มก.โปรตีน/มก.เอนไซม์)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิต/มก.โปรตีน)
ไลเปส PS	6.40	0.07	96.83
ไลเปส D	406.92	1.10	370.47
ไลเปส Lipozyme® IM ¹	0.13	-	-

¹: เอนไซม์ตรึงรูปทางการค้า

ตารางที่ 7 กิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึงและกิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

เอนไซม์ไลเปส	ตัวพุง	กิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึง (ยูนิต/มก.เอนไซม์ตรึงรูป)	กิจกรรมการยึดเกาะ (ร้อยละ)
ไลเปส PS ¹	แอกคูเรล	0.94 ^a	18.80 ^a
	ซีไลท์	0.08 ^b	1.60 ^b
	ซิลิกาเจล	0.18 ^c	3.60 ^c
ไลเปส D ²	แอกคูเรล	1.45 ^d	3.56 ^d
	ซีไลท์	0.04 ^e	0.10 ^e
	ซิลิกาเจล	0.04 ^e	0.10 ^e

¹: ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายเอนไซม์ไลเปส PS เท่ากับ 7.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
(50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

²: ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายเอนไซม์ไลเปส D เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
(406.93 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

^a, ^b, ^c, ^d, ^e, : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงว่าค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกัน
($p > 0.05$) (ไม่ได้เปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์)

3. การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าด้วยเอนไซม์ไลเปส

3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-PS

การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-PS โดยการใช้เอนไซม์ไลเปส PS เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่า ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 8 พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปส PS อิสระในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่า ทำให้ได้ปริมาณกรดไขมันอิสระร้อยละ 51.37 ซึ่งมีปริมาณ ω -3 PUFAs (EPA และ DHA) ร้อยละ 35.63 ของกรดไขมันทั้งหมด คิดเป็น % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น เท่ากับร้อยละ 54.47 ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์ไลเปส PS ที่ตรึงรูปแบบแอดคูเรลจะให้ค่าที่สูงกว่า เท่ากับร้อยละ 55.28, 39.56 และ 65.09 ตามลำดับ โดยใช้ยูนิตของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาที่เท่ากันนั้น อาจเป็นผลเนื่องมาจากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนแอดคูเรลซึ่งเป็นตัวพวงที่ไม่ชอบน้ำมีโอกาสสัมผัสกับน้ำมันได้มากกว่า ส่งผลให้เอนไซม์ตรึงรูปสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาได้สูงกว่าเอนไซม์อิสระ (Malcata *et al.*, 1990;1992)

ตารางที่ 8 การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS โดยใช้เอนไซม์ไลเปส PS อิสระและตรึงรูป

เอนไซม์ ไลเปส PS	ปริมาณ FFA-PS ที่ได้หลัง การเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)	ปริมาณกรดไขมัน ในส่วนของ FFA-PS (ร้อยละ)			% recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS ¹
		EPA	DHA	ω -3 PUFAs	
อิสระ	51.37 ^a	6.45	29.18	35.63 ^a	54.47 ^a
ตรึงรูป	55.28 ^b	7.22	32.34	39.56 ^b	65.09 ^b

¹: % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น

^a, ^b: ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงว่าค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-PS โดยการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาพูน่าด้วยเอนไซม์ไลเปส PS โครงสร้างการคัดเลือกพิจารณาจาก % recovery สูงสุดของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาพูน่าเริ่มต้น โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ ปริมาณน้ำ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปส PS โครงสร้างตั้งแต่ 10-100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาพูน่า ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 15 จะเห็นว่าการใช้ปริมาณเอนไซม์โครงสร้างที่สูงขึ้นทำให้การย่อยสลาย ω -3 PUFAs ออกจากโมเลกุลน้ำมันปลาได้สูงขึ้น ส่งผลให้ % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS สูงขึ้นด้วย โดยมีค่าสูงถึงร้อยละ 71.98 เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปส PS โครงสร้าง 30 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากกว่านี้ทำให้ค่าทั้ง 2 ลดลง อาจเนื่องมาจากการเพิ่มปริมาณเอนไซม์โครงสร้างนอกจากปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นแล้วปริมาณแอสคูเรลในปฏิกิริยาก็เพิ่มขึ้นด้วย ทำให้สัดส่วนของปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ปริมาณผิวสัมผัสระหว่างน้ำมันกับน้ำลดลง ส่งผลให้การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสลดลง

ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์ 30 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม เพื่อใช้ในการศึกษาผลของปริมาณน้ำในปฏิกิริยา โดยใช้ปริมาณน้ำตั้งแต่ร้อยละ 30-70 ของน้ำหนักส่วนผสม ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 16 พบว่ากรดไขมันอิสระ FFA-PS ที่เกิดขึ้นมีปริมาณลดลงเมื่อปริมาณน้ำในปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ส่วน % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อใช้ปริมาณน้ำร้อยละ 30-50 และมีค่าลดลงอย่างมากเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในปฏิกิริยาเป็นร้อยละ 60-70 จะเห็นว่าปฏิกิริยาเกิดได้ดีในช่วงที่น้ำในปฏิกิริยามีปริมาณน้อยกว่าน้ำมันซึ่งทำให้ภายในปฏิกิริยามีลักษณะของอิมัลชันเป็นแบบน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) โมเลกุลของน้ำถูกล้อมรอบด้วยน้ำมัน ทำให้น้ำมันมีโอกาสสัมผัสกับเอนไซม์ไลเปสซึ่งเกาะกับตัวพองที่ไม่ชอบน้ำได้ดีกว่า (Malcata *et al.*, 1990) โดย % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS มีค่าสูงสุด เท่ากับร้อยละ 73.81 เมื่อมีปริมาณน้ำในปฏิกิริยาร้อยละ 40 ของน้ำหนักส่วนผสม

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปส PS โครงสร้าง 30 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม และเติมน้ำในปฏิกิริยาร้อยละ 40 ของน้ำหนักส่วนผสม ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 17 พบว่าปริมาณกรดไขมันอิสระ FFA-PS มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา ส่วน % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เพิ่มขึ้นสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เท่ากับร้อยละ 87.04

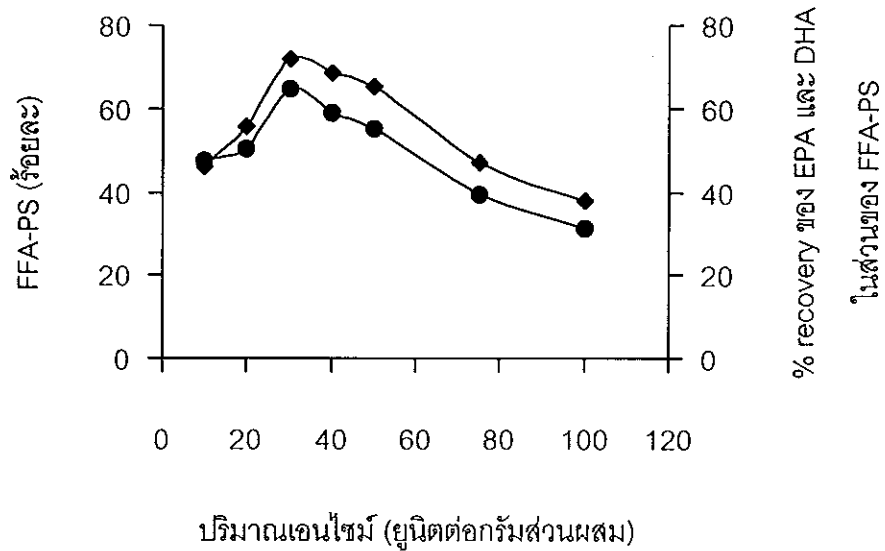
โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่านี้ค่าที่ได้จะลดลง เนื่องจาก ω -3 PUFAs เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงซึ่งภายในโมเลกุลมีหลายพันธะคู่ ทำให้เสถียรภาพได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (Stansby, 1990)

จากสภาวะทั้งหมดที่คัดเลือกได้ เมื่อนำมาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่า โดยเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 24 จะเห็นว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 12 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นการเพิ่มจะค่อยๆ ช้าลงจนคงที่ โดยที่ชั่วโมงที่ 18 พบว่าเกิดกรดไขมันอิสระ FFA-PS และ % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS สูงสุด เท่ากับร้อยละ 79.95 และ 87.04 ตามลำดับ

กล่าวโดยสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-PS โดยการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่าด้วยเอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูป คือ น้ำมันปลาทูน่าและน้ำ ในอัตราส่วน 1.5:1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก (ปริมาณน้ำร้อยละ 40 ของน้ำหนักส่วนผสม) เอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูป 30 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เกิดกรดไขมันอิสระ FFA-PS สูงสุด เท่ากับร้อยละ 79.95 โดยมีปริมาณ ω -3 PUFAs เท่ากับร้อยละ 36.58 (EPA ร้อยละ 6.50 และ DHA ร้อยละ 30.08) ซึ่งคิดเป็น % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS สูงสุด เท่ากับร้อยละ 87.04 แต่จากการทดลองของ Shimada และคณะ (1997a) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในแง่ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่าเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปส AK อิสระ คือ น้ำมันปลาทูน่า 2.5 กรัม และน้ำ 2.5 กรัม (ปริมาณน้ำร้อยละ 50 ของน้ำหนักส่วนผสม) เอนไซม์ไลเปส 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ร้อยละ 79 มีปริมาณ DHA ในส่วนของกรดไขมันอิสระร้อยละ 24.2 ซึ่งคิดเป็น % recovery ของ DHA ในส่วนของกรดไขมันอิสระ เท่ากับร้อยละ 83

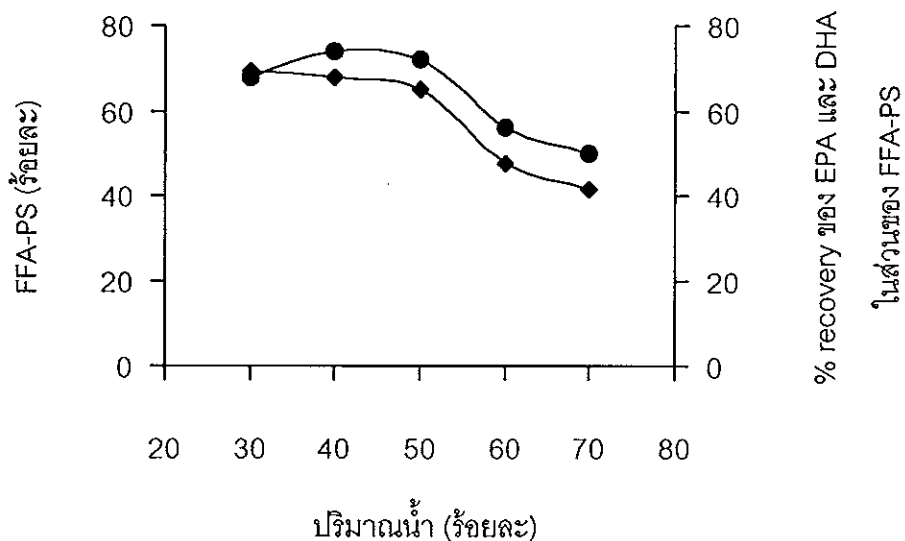
3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-D

การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-PS ที่ได้จากข้อ 3.1 ให้สูงขึ้น โดยใช้เอนไซม์ไลเปส D เร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดไขมันอิสระ FFA-PS กับลอริลแอลกอฮอล์ โดยเอนไซม์ไลเปส D นอกจากมีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์แล้ว ยังมีความจำเพาะต่อกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่ำๆ อีกด้วย ทำให้มีกิจกรรมต่อ ω -3 PUFAs ต่ำจึงเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมัน



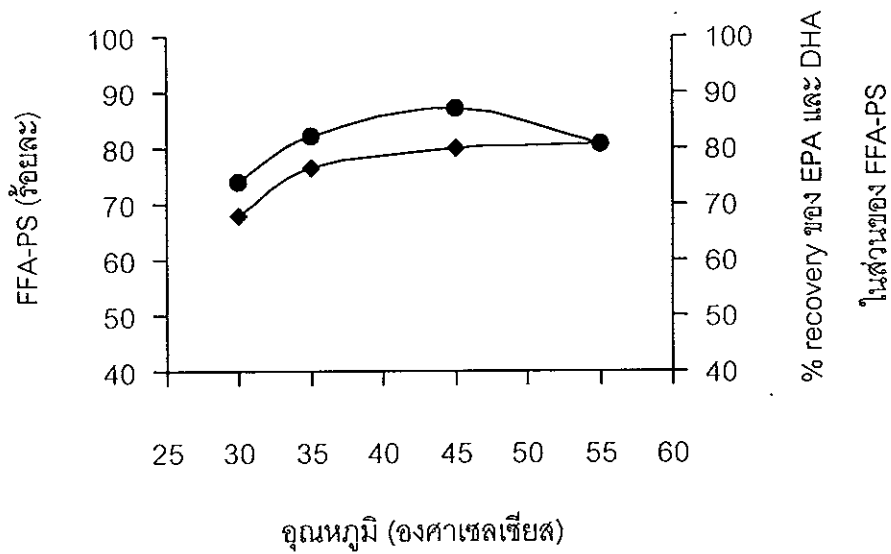
◆ ปริมาณ FFA-PS ที่ได้หลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)

- % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เทียบกับปริมาณเริ่มต้น
- ภาพที่ 15 ผลของปริมาณเอนไซม์ในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS



◆ ปริมาณ FFA-PS ที่ได้หลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)

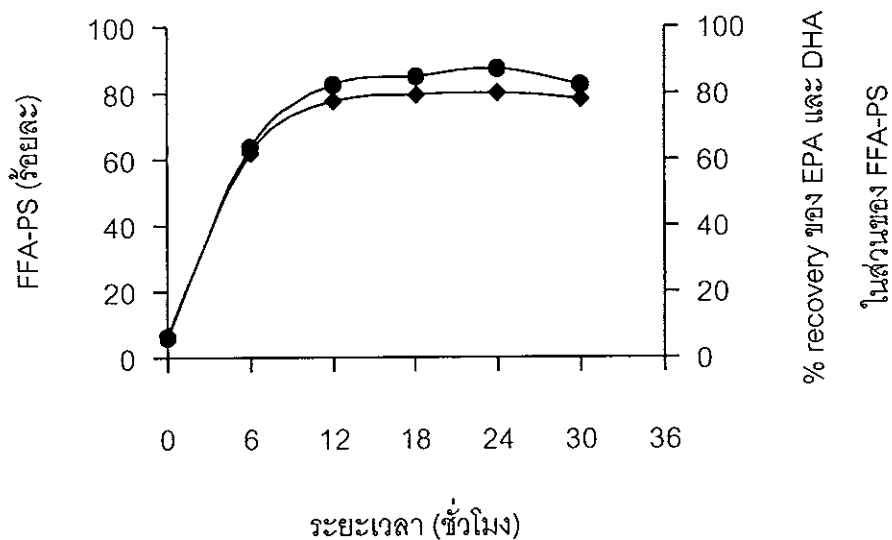
- % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เทียบกับปริมาณเริ่มต้น
- ภาพที่ 16 ผลของปริมาณน้ำในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS



◆ ปริมาณ FFA-PS ที่ได้หลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)

- % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เทียบกับปริมาณเริ่มต้น

ภาพที่ 17 ผลของอุณหภูมิในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS



◆ ปริมาณ FFA-PS ที่ได้หลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)

- % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เทียบกับปริมาณเริ่มต้น

ภาพที่ 18 ผลของระยะเวลาในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS

ที่ไม่ใช่ ω -3 PUFAs กับลิวคอสแอลกอฮอล์ให้กลายเป็นสารประกอบเอสเทอร์ ทำให้ในส่วนของกรดไขมันอิสระที่เหลืออยู่มีความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs เพิ่มขึ้น (Shimada *et al.*, 1997b) ผลิตภัณฑ์ที่ได้ในขั้นตอนนี้ เรียกว่า กรดไขมันอิสระ FFA-D โดย FFA-PS ที่ใช้ในปฏิกริยามีปริมาณ ω -3 PUFAs เท่ากับร้อยละ 36.58 ของกรดไขมันทั้งหมด จากผลการทดลอง (ตารางที่ 9) จะเห็นว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระทำให้เหลือปริมาณ FFA-D ในปฏิกริยามากกว่าเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนแอดคูเรล ซึ่งเท่ากับร้อยละ 30.55 และ 22.34 ตามลำดับ แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระเกิดปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้ดีกว่าเอนไซม์ตรึงรูป เมื่อพิจารณาที่ปริมาณ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D จะเห็นว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระได้ปริมาณ ω -3 PUFAs ร้อยละ 49.54 ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งต่ำกว่าเมื่อใช้เอนไซม์ตรึงรูป คือมีถึงร้อยละ 52.60 ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งอธิบายได้เช่นเดียวกับข้อ 3.1

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-D โดยการทำให้ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่าง FFA-PS กับแอลกอฮอล์ด้วยเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูป การคัดเลือกพิจารณาจากปริมาณของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D สูงสุด โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเกิดปฏิกริยา คือ ปริมาณเอนไซม์ ปริมาณน้ำ อัตราส่วนของ FFA-PS กับลิวคอสแอลกอฮอล์ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการทำปฏิกริยา ในการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปปริมาณที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 50-750 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 19 พบว่าปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปที่เหมาะสม คือ 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม ทำให้ในส่วนของ FFA-D มีปริมาณ ω -3 PUFAs เท่ากับร้อยละ 52.60 ของกรดไขมันทั้งหมด แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากขึ้น พบว่าปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเกิดได้ดีขึ้นโดยดูได้จากปริมาณ FFA-D ที่เหลือในปฏิกริยาลดลง แต่ปริมาณ ω -3 PUFAs ลดลงด้วย อาจเนื่องมาจากผลของการตรึงเอนไซม์ทำให้ความจำเพาะของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงได้ (Malcata *et al.*, 1990; 1992) ทำให้เอนไซม์ไลเปส D มีกิจกรรมในการเอสเทอร์ฟายด์ ω -3 PUFAs ไปเป็นสารประกอบเอสเทอร์สูงขึ้น

เมื่อศึกษาผลของปริมาณน้ำที่ใช้ในปฏิกริยา โดยให้ปริมาณเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูป 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม ปริมาณน้ำตั้งแต่ร้อยละ 5-40 ของน้ำหนักส่วนผสม ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 20 พบว่าที่ปริมาณน้ำร้อยละ 20 มีปริมาณ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D สูงสุด เท่ากับร้อยละ 52.60 ของกรดไขมันทั้งหมด เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในปฏิกริยาทำให้ปริมาณ ω -3 PUFAs ลดลง อาจเนื่องมาจากปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกริยาที่ต้องการน้ำในปริมาณเพียงเล็กน้อยเพื่อใช้ในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสเท่านั้น หากมีปริมาณน้ำน้อยเกินไปอาจมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเกิดได้ไม่ดี และปริมาณน้ำที่มากเกินไปอาจทำให้เกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซิสขึ้น

ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการต่ำ (Malcata *et al.*, 1990; 1992; Balcao *et al.*, 1996)

อัตราส่วนของ FFA-PS และลอริลแอลกอฮอล์ ที่ใช้ในการศึกษา คือตั้งแต่ 1:1 ถึง 1: 5 โมลต่อโมล โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม และปริมาณน้ำร้อยละ 20 ของน้ำหนักส่วนผสม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 21 จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของลอริลแอลกอฮอล์ก็จะทำให้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเกิดเพิ่มขึ้นด้วย โดยได้ปริมาณ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-D สูงสุด เท่ากับร้อยละ 64.35 ของกรดไขมันทั้งหมด ที่อัตราส่วน 1:3 แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนมากกว่าปฏิกิริยาเกิดเพิ่มขึ้นในขณะที่ปริมาณ ω -3 PUFAs ลดลง เป็นไปได้ว่าการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ จะมีผลทำให้ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงได้ (Malcata *et al.*, 1990; Cerdan *et al.*, 1998) ในกรณีนี้อาจทำให้เอนไซม์ไลเปส D มีความจำเพาะในเอสเทอร์ฟายด์ ω -3 PUFAs ไปเป็นสารประกอบเอสเทอร์ได้เพิ่มขึ้น จึงทำให้ปริมาณ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D ลดลงแม้ว่าจะเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเพิ่มขึ้น

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาโดยใช้อัตราส่วนของ FFA-PS และลอริลแอลกอฮอล์ 1:3 โมลต่อโมล ปริมาณเอนไซม์ 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม และปริมาณน้ำร้อยละ 20 ของน้ำหนักส่วนผสม ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 22 พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้ดีที่สุดและมีปริมาณ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D สูงสุด เท่ากับร้อยละ 64.35 ของกรดไขมันทั้งหมด แสดงว่าเอนไซม์ไลเปส D โครงสร้างเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิสูงอาจมีผลทำให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติได้ (Malcata *et al.*, 1990; 1992) และนอกจากนี้ที่อุณหภูมิสูงทำให้ ω -3 PUFAs ถูกทำลายได้ด้วย (Stansby, 1990)

จากสภาวะทั้งหมดที่คัดเลือกได้ เมื่อนำมาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 23 จะเห็นว่าปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 6 ชั่วโมงแรกแล้วค่อยๆ คงที่ ส่วนปริมาณ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วง 18-24 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 64.45 ของกรดไขมันทั้งหมด เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาต่อไป พบว่าปริมาณ ω -3 PUFAs ลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาที่ต้องการน้ำในปริมาณเล็กน้อยเพื่อใช้ในการทำงานของเอนไซม์ไลเปส แต่การเกิดปฏิกิริยามีน้ำเป็นผลิตภัณฑ์อย่างหนึ่ง หากไม่มีวิธีการกำจัดน้ำออกจากปฏิกิริยาที่ดีพอ เมื่อปฏิกิริยาเกิดนานขึ้นจะทำให้เกิดการสะสมของน้ำภายในส่วนผสมของ

ปฏิกิริยา อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสขึ้นแทนทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการน้อยลง

ผลการศึกษาสภาวะในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด สรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ กรดไขมันอิสระ FFA-PS ต่อลอลิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1:3 โมลต่อโมล ปริมาณน้ำร้อยละ 20 ของน้ำหนักส่วนผสม เอนไซม์ไลเปส D ทรงรูป 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ได้ปริมาณ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D เท่ากับร้อยละ 64.45 ของกรดไขมันทั้งหมด (EPA ร้อยละ 5.44 และ DHA ร้อยละ 59.01) ส่วนการทดลองของ Shimada และคณะ (1997b) ซึ่งใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus delemar* เร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่าง DHA ที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปลาทูนากับแอลกอฮอล์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ DHA ต่อลอลิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1.2 (โมลต่อโมล) ปริมาณน้ำร้อยละ 20 ของน้ำหนักส่วนผสม เอนไซม์ไลเปส 200 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ทำให้ได้ปริมาณของ DHA ในส่วนของกรดไขมันอิสระสูงสุดถึงร้อยละ 73 และนอกจากนี้ Shimada และคณะ (1998) ใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus delemar* ที่ถูกตรึงรูปบนเซรามิก เร่งปฏิกิริยาแอลกอฮอล์เอสเทอร์ระหว่างเอทิลดีเอชเอและเอทิลอีเอชเอ (Ethyl-DHA, Ethyl-EPA) กับลอลิลแอลกอฮอล์ ในสภาวะที่มี E-EPA และ E-DHA กับลอลิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1:2 โมลต่อโมล น้ำหนัก 12 กรัม และน้ำ 240 ไมโครกรัม (ปริมาณน้ำร้อยละ 2 ของน้ำหนักส่วนผสม) เอนไซม์ไลเปส 480 มิลลิกรัม เขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของ DHA ในส่วนของเอทิลเอสเทอร์เพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 22.7 เป็น 48.9 ส่วนปริมาณของ EPA เพิ่มไม่สูงมากนัก คือเพิ่มจากร้อยละ 9.2 เป็น 14.9

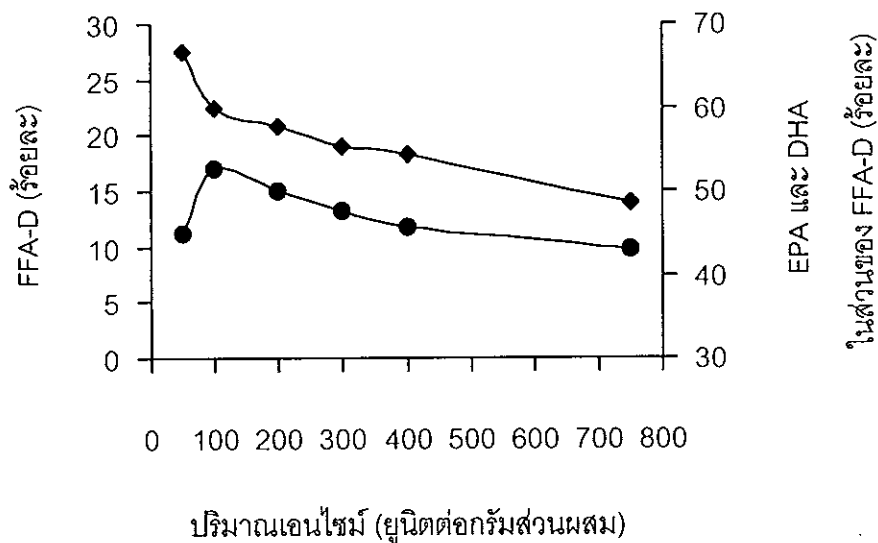
3.3 การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ MG-D

การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ MG-D โดยการใส่เอนไซม์ไลเปส D และ OF เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่าในตัวทำละลายอินทรีย์ 2 สองชนิด คือ เมทิลเติร์ตบิวทิลอีเทอร์ (Methyl-tert-Buthyl-Ether, MTBE) และปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum Ether, PE) เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์พวกอีเทอร์สามารถป้องกันการเกิดการย้ายหมู่เอซิล (acyl migration) ได้โดยเฉพาะ MTBE ซึ่งมีประสิทธิภาพสูง โดยการย้ายหมู่เอซิล หมายถึง การย้ายของหมู่เอซิลจากตำแหน่งที่ 2 ของโมโนกลีเซอไรด์ ไปสร้างพันธะในตำแหน่ง 1 หรือ 3 แทน ทำให้ได้เป็น 1- หรือ 3-โมโนกลีเซอไรด์เป็นผลิตภัณฑ์ (Schmid *et al.*, 1999) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 10 จะเห็นว่าสภาวะที่ใช้ MTBE และเอนไซม์ไลเปส D เท่านั้นที่สามารถผลิตโมโนกลีเซอไรด์ได้ โดยมีปริมาณ MG-D เท่ากับร้อยละ 22.45 และ % recovery ของ ω -3 PUFAs

ตารางที่ 9 การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D โดยใช้เอนไซม์ไลเปส D อีตระและตริงรูป

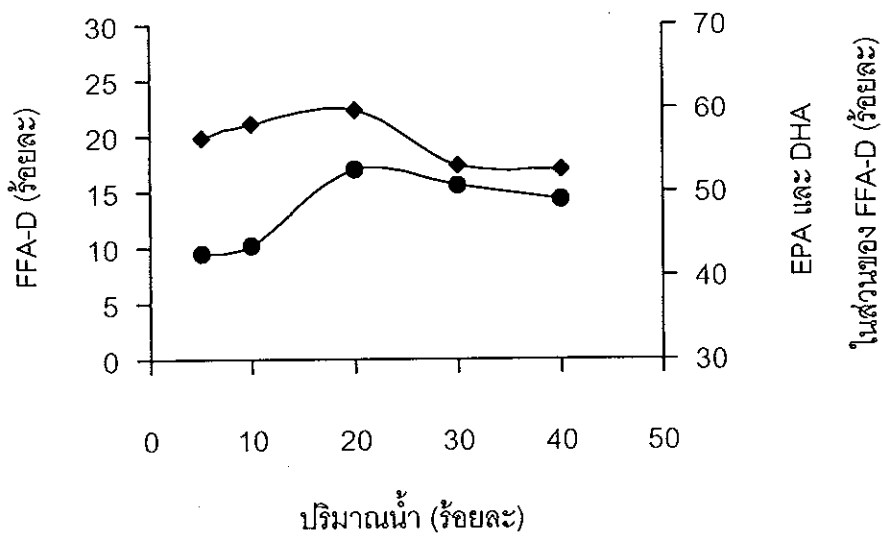
เอนไซม์ ไลเปส D	ปริมาณ FFA-D ที่เหลือ หลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)	ปริมาณกรดไขมันในส่วนของ FFA-D (ร้อยละ)		
		EPA	DHA	ω -3 PUFAs
อีตระ	30.55 ^a	6.80	42.74	49.54 ^a
ตริงรูป	22.34 ^b	5.71	47.04	52.60 ^b

^a, ^b: ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงว่าค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)



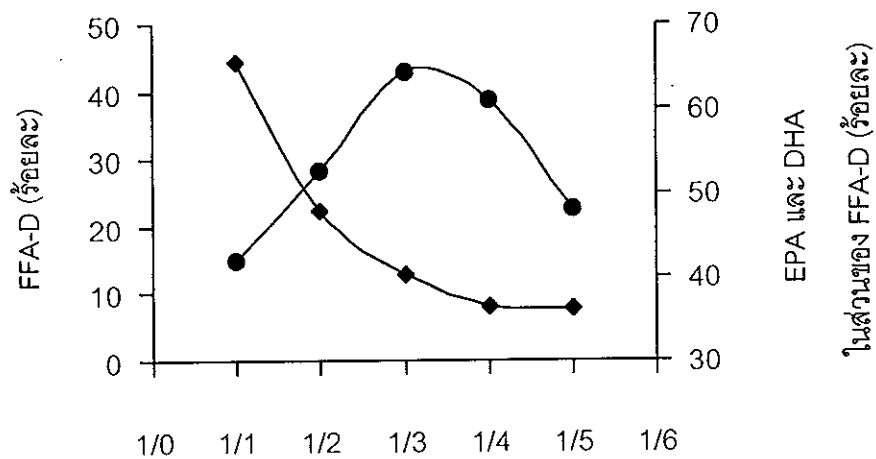
- ◆ ปริมาณ FFA-D ที่เหลือหลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)
- ปริมาณ EPA และ DHA ในส่วนของ FFA-D (ร้อยละ)

ภาพที่ 19 ผลของปริมาณเอนไซม์ในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D



- ◆ ปริมาณ FFA-D ที่เหลือหลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)
- ปริมาณ EPA และ DHA ในส่วนของ FFA-D (ร้อยละ)

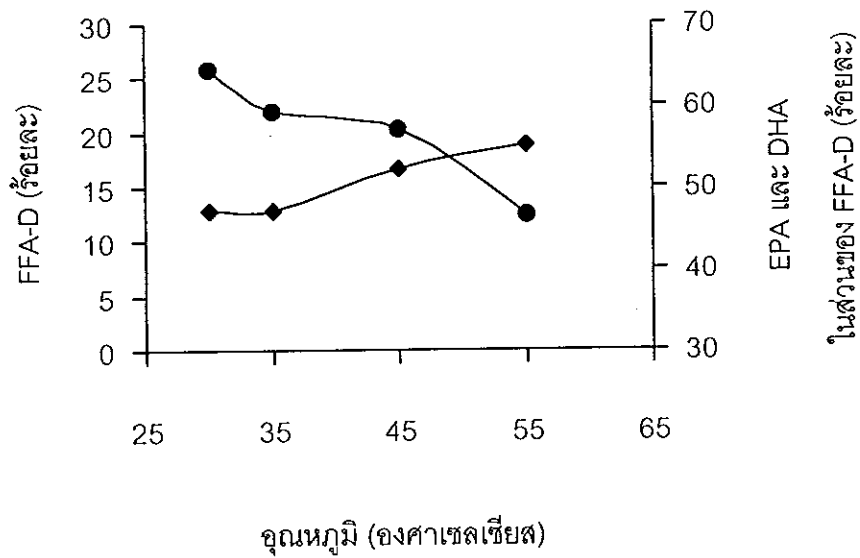
ภาพที่ 20 ผลของปริมาณน้ำในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D



อัตราส่วน FFA-PS ต่อคอเลสเตอรอล (โมลต่อโมล)

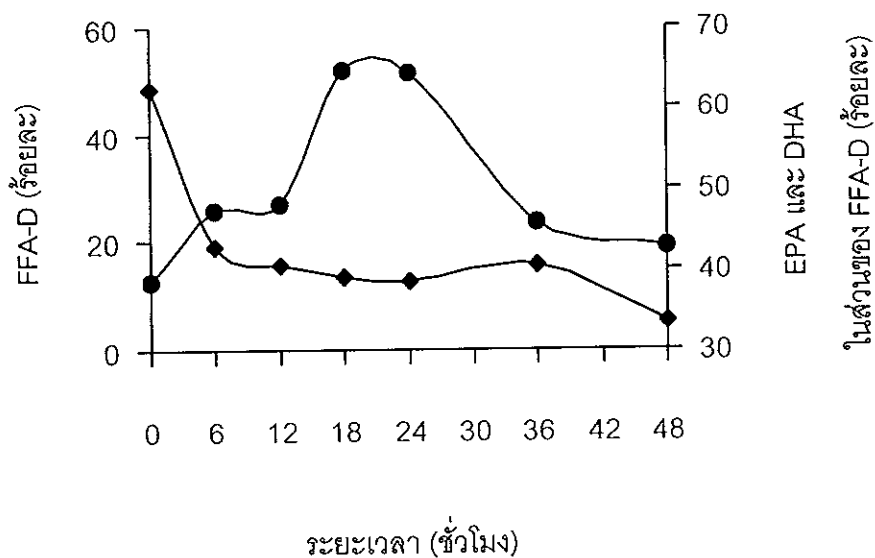
- ◆ ปริมาณ FFA-D ที่เหลือหลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)
- ปริมาณ EPA และ DHA ในส่วนของ FFA-D (ร้อยละ)

ภาพที่ 21 ผลของอัตราส่วนของ FFA-PS ต่อคอเลสเตอรอลในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D



- ◆ ปริมาณ FFA-D ที่เหลือหลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)
- ปริมาณ EPA และ DHA ในส่วนของ FFA-D (ร้อยละ)

ภาพที่ 22 ผลของคอเลสเตอรอลในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D



- ◆ ปริมาณ FFA-D ที่เหลือหลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)
- ปริมาณ EPA และ DHA ในส่วนของ FFA-D (ร้อยละ)

ภาพที่ 23 ผลของระยะเวลาในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ MG-D

การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ MG-D โดยการใช้น้ำมันโซมาโลเปส D และ OF เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่าในตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ เมทิลเทิร์ตบิวทิลอีเทอร์ (Methyl-*tert*-Butyl-Ether, MTBE) และปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum Ether, PE) เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์พวกอีเทอร์สามารถป้องกันการเกิดการย้ายหมู่เอซิล (acyl migration) ได้โดยเฉพาะ MTBE ซึ่งมีประสิทธิภาพสูง โดยการย้ายหมู่เอซิล หมายถึง การย้ายของหมู่เอซิลจากตำแหน่งที่ 2 ของโมโนกลีเซอไรด์ ไปสร้างพันธะในตำแหน่ง 1 หรือ 3 แทน ทำให้ได้เป็น 1- หรือ 3-โมโนกลีเซอไรด์เป็นผลิตภัณฑ์ (Schmid *et al.*, 1999) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 10 จะเห็นว่าสภาวะที่ใช้ MTBE และน้ำมันโซมาโลเปส D เท่านั้นที่สามารถผลิตโมโนกลีเซอไรด์ได้ โดยมีปริมาณ MG-D เท่ากับร้อยละ 22.45 และ % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น เท่ากับร้อยละ 28.41 ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันโซมาโลเปส D มีความจำเพาะต่อกรดไขมันในตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ จึงทำให้น้ำมันโซมาโลเปส D เร่งปฏิกิริยาของกรดไขมันอื่นๆ ที่ไม่ใช่ ω -3 PUFAs ซึ่งอยู่ในตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ได้ดีกว่าน้ำมันโซมาโลเปส OF ซึ่งเป็นน้ำมันที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์เป็นแบบสุ่ม (random) (Shimada *et al.*, 1997b; Soumanou *et al.*, 1998) จึงเลือกใช้น้ำมันโซมาโลเปส D ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่าใน MTBE เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ต่อไป

เมื่อศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของน้ำมันโซมาโลเปส D อิสระและตรึงรูปที่มีการเติม MTBE และไม่มีเติม โดยใช้สภาวะอื่นๆ เช่นเดียวกันนั้น พบว่าในปฏิกิริยาที่ไม่มีเติม MTBE ไม่สามารถผลิต MG-D ได้เลย (ตารางที่ 11) เป็นไปได้ว่าเมื่อเกิดการย่อยสลายกรดไขมันที่ไม่ใช่ ω -3 PUFAs ออกจากโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ แล้วมีการสร้างพันธะเอสเทอร์ขึ้นใหม่ระหว่างกรดไขมันอิสระที่เกิดจากการย่อยสลายและยังอยู่ในส่วนผสมของปฏิกิริยากับโมโนกลีเซอไรด์ แสดงให้เห็นว่า MTBE สามารถป้องกันการสร้างพันธะระหว่างกรดไขมันอิสระกับโมโนกลีเซอไรด์ได้ ในสภาวะที่มีการเติม MTBE พบว่าเมื่อใช้น้ำมันโซมาโลเปส D อิสระ ทำให้ได้ปริมาณ MG-D ร้อยละ 16.18 น้อยกว่าเมื่อใช้น้ำมันโซมาโลเปสตรึงรูป (ร้อยละ 22.45) แต่ MG-D ที่ได้จากการใช้น้ำมันโซมาโลเปสอิสระมีปริมาณ ω -3 PUFAs สูงกว่า ซึ่งเมื่อคิดเป็น % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D แล้ว พบว่าค่าที่ได้จากการใช้น้ำมันโซมาโลเปสตรึงรูปสูงกว่าจากการใช้น้ำมันอิสระ เป็นไปได้ว่าการตรึงรูปทำให้ความจำเพาะของน้ำมันเปลี่ยนแปลงไป (Malcata *et al.*, 1990; Balcao *et al.*, 1996)

ตารางที่ 10 การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D โดยใช้เอนไซม์ไลเปส OF และ D ตรึงรูป

ไลเปส ตรึงรูป	ตัวทำ ละลาย อินทรีย์	ปริมาณองค์ประกอบใน ส่วนผสมหลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)				ปริมาณกรดไขมัน ในส่วนของ MG-D (ร้อยละ)			% recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ Mg-D ¹
		TG	DG	MG	FFA	EPA	DHA	ω -3 PUFAs	
OF	MTBE	49.16	0	2.15	48.69	-	-	-	-
OF	PE	44.99	3.26	0.26	51.49	-	-	-	-
D	MTBE	1.84	0	22.45	75.71	6.04	36.47	42.51	28.41
D	PE	34.32	6.10	0.63	58.95	-	-	-	-

¹:% recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น

ตารางที่ 11 การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ MG-D โดยใช้เอนไซม์ไลเปส D อิสระและตรึงรูป

ไลเปส D	ตัวทำ ละลาย อินท รี	ปริมาณองค์ประกอบใน ส่วนผสมหลังเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)				ปริมาณกรดไขมัน ในส่วนของ MG-D (ร้อยละ)			% recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ Mg-D ¹
		TG	DG	MG	FFA	EPA	DHA	ω -3 PUFAs	
อิสระ	-	40.18	13.14	2.91	43.27	-	-	-	-
อิสระ	MTBE	11.30	0	16.18 ^a	72.52	6.53	44.55	51.30 ^a	24.71 ^a
ตรึงรูป	-	24.24	5.73	1.60	68.43	-	-	-	-
ตรึงรูป	MTBE	1.84	0	22.45 ^b	75.71	6.04	36.47	42.51 ^b	28.41 ^b

¹:% recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น

^a, ^b: ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงว่าค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ MG-D โดยการทำให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่าด้วยเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปการคัดเลือกพิจารณาจาก % recovery สูงสุดของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ ปริมาณน้ำ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา ในการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูป (ภาพที่ 24) พบว่า ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการผลิต MG-D ที่มี ω -3 PUFAs สูง คือที่ระดับ 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม โดยได้ % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D สูงสุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์ 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม

ในการศึกษาผลของปริมาณน้ำที่ใช้ในปฏิกิริยา โดยใช้ปริมาณน้ำตั้งแต่ร้อยละ 30-70 ของน้ำหนักส่วนผสม ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 25 พบว่าเมื่อปริมาณน้ำในปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณ MG-D และ % recovery ของ ω -3 PUFAs เพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นสูงสุด เท่ากับร้อยละ 19.48 และ 32.86 ตามลำดับ เมื่อมีปริมาณน้ำในปฏิกิริยาร้อยละ 50 ซึ่งปริมาณน้ำที่มากกว่านี้จะทำให้เกิดปฏิกิริยาลดลงเล็กน้อย

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูป 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม และเติมน้ำในปฏิกิริยาร้อยละ 50 ของน้ำหนักส่วนผสม ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 26 พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดปริมาณ MG-D และ % recovery ของ ω -3 PUFAs สูงสุด แสดงว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูป คือ 30 องศาเซลเซียส

จากสภาวะทั้งหมดที่คัดเลือกได้ เมื่อนำมาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (ภาพที่ 27) พบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 6 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12-24 โดยที่ชั่วโมงที่ 18 พบว่าเกิดปริมาณ MG-D และ % recovery ของ ω -3 PUFAs สูงสุด เท่ากับร้อยละ 19.89 และ 33.49 ตามลำดับ และหลังจากชั่วโมงที่ 24 ค่าที่ได้ทั้งสองลดลง อาจเกิดจากกรดไขมันอิสระสร้างพันธะเอสเทอร์ขึ้นใหม่กับ MG-D ทำให้ปริมาณ MG-D ที่มี ω -3 PUFAs สูงลดลง จากผลการทดลองจะเห็นว่าที่ชั่วโมงที่ 12 ของการทำปฏิกิริยาค่าที่ได้ต่ำกว่าที่ชั่วโมงที่ 18 เพียงแค่อ้อยู่ 1 เท่านั้น ดังนั้นจึงสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12

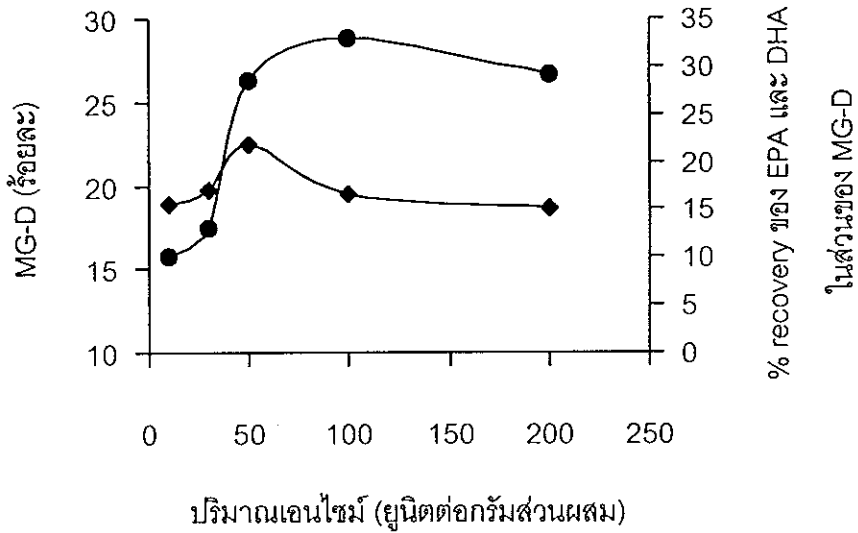
สรุปสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ MG-D โดยการทำให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่าด้วยเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปได้ว่าใช้น้ำมันปลาทูน่าและน้ำในอัตราส่วน 1:1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก (ปริมาณน้ำร้อยละ 50 ของน้ำหนัก

ส่วนผสม) เอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูป 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเกิดโมโนกลีเซอไรด์ MG-D สูงสุด เท่ากับ ร้อยละ 19.89 โดยมีปริมาณ ω -3 PUFAs เท่ากับร้อยละ 56.57 (EPA ร้อยละ 6.92 และ DHA ร้อยละ 49.65) ซึ่งคิดเป็น % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D สูงสุด เท่ากับร้อยละ 33.49 แต่จากการทดลองของ Tanaka และคณะ (1992) ในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกลีเซอไรด์รวม (glycerides mixture fraction) ซึ่งประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida cylindracea* 200 ยูนิตต่อกรัมของน้ำมันปลาทูน่า แรงปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสภาวะที่มีน้ำมันปลาทูน่า 50 กรัม และน้ำ 50 กรัม กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง พบว่าเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสร้อยละ 70 ให้ปริมาณ EPA และ DHA ในส่วนของกลีเซอไรด์รวม เท่ากับ ร้อยละ 4.1 และ 53.1 ตามลำดับ โดยในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้นมีปริมาณของ EPA และ DHA เท่ากับร้อยละ 5.6 และ 25.1 ตามลำดับ

นอกจากนี้ Shimada และคณะ (1994) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida cylindracea* (*Geotrichum candidum*) 400 ยูนิต แรงปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปลาทูน่าเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกลีเซอไรด์รวม ในสภาวะที่มีน้ำมันปลาทูน่า 2 กรัม และน้ำ 2 กรัม กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำให้ในส่วนของกลีเซอไรด์มีปริมาณของ EPA และ DHA เท่ากับร้อยละ 48.7 และเมื่อทำปฏิกิริยาซ้ำอีกครั้ง พบว่าปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 57.5 ซึ่งคิดเป็น % recovery ของ EPA และ DHA ในส่วนของกลีเซอไรด์ เท่ากับร้อยละ 81.5 โดยในส่วนของกลีเซอไรด์ พบว่ามีปริมาณของไตรกลีเซอไรด์สูงสุด เท่ากับ ร้อยละ 85.5 และมีโมโนกลีเซอไรด์เพียงร้อยละ 2.3 เท่านั้น

3.4 การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ให้อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์

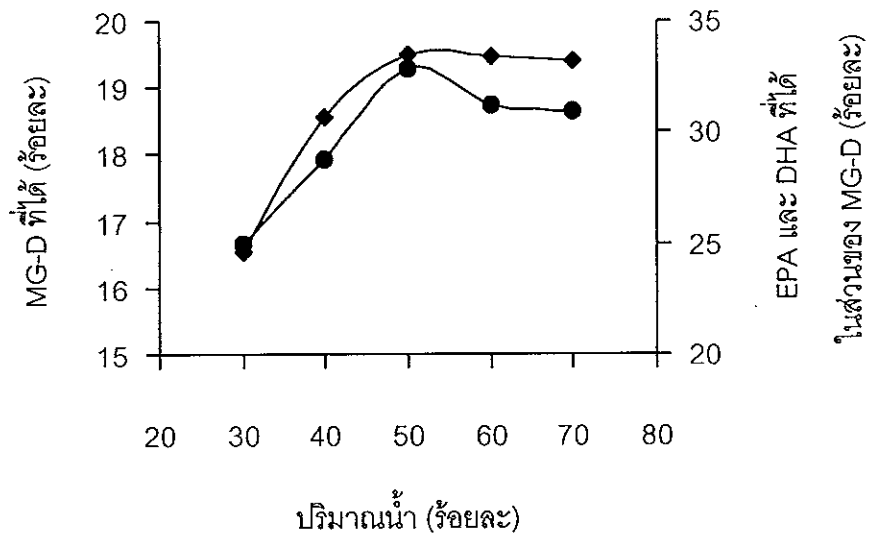
การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ให้อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Lipozyme® IM แรงปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดไขมันอิสระที่มี ω -3 PUFAs สูง (FFA-D) กับโมโนกลีเซอไรด์ที่มี ω -3 PUFAs สูง (MG-D) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 12 พบว่าเมื่อไม่มีการเติมเอนไซม์ในปฏิกิริยาจะไม่สามารถผลิตไตรกลีเซอไรด์ได้ และเมื่อเติมเอนไซม์ในปฏิกิริยาจึงมีการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Lipozyme® IM เป็นเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อ *Mucor miehei* ซึ่งมีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 ของโมเลกุล



◆ ปริมาณ MG-D ที่ได้หลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)

- % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D เทียบกับปริมาณเริ่มต้น

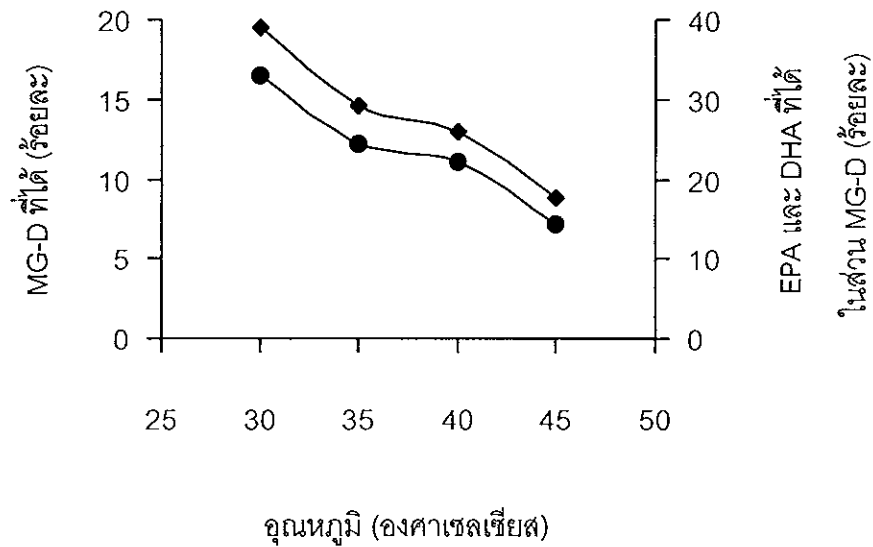
ภาพที่ 24 ผลของปริมาณเลซิทินในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D



◆ ปริมาณ MG-D ที่ได้หลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)

- % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D เทียบกับปริมาณเริ่มต้น

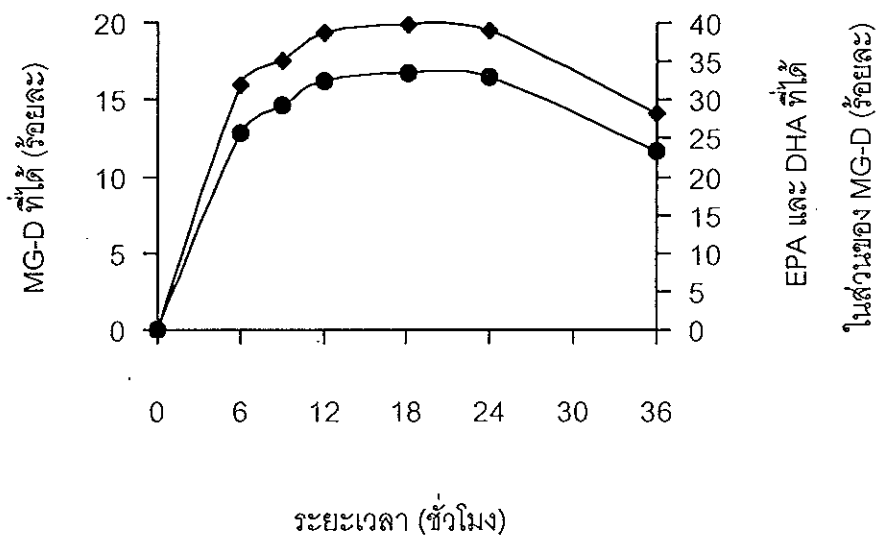
ภาพที่ 25 ผลของปริมาณน้ำในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D



◆ ปริมาณ MG-D ที่ได้หลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)

- % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D เทียบกับปริมาณเริ่มต้น

ภาพที่ 26 ผลของอุณหภูมิในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D



◆ ปริมาณ MG-D ที่ได้หลังการเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)

- % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D เทียบกับปริมาณเริ่มต้น

ภาพที่ 27 ผลของระยะเวลาในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D

ไตรกลีเซอไรด์ (Zuyi and Ward, 1993; Lee and Akoh, 1996; Cerdan *et al.*, 1998 and Soumanou *et al.*, 1998) และเมื่อศึกษาผลของอัตราส่วนของ MG-D และ FFA-D ในการทำปฏิกิริยา พบว่าที่อัตราส่วน 1:2 ทำให้ได้ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ร้อยละ 64.40 โดยมีปริมาณ ω -3 PUFAs ในส่วนของไตรกลีเซอไรด์ เท่ากับร้อยละ 74.11 ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งคิดเป็น % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของไตรกลีเซอไรด์ เท่ากับร้อยละ 47.73 ซึ่งการใช้อัตราส่วน 1:3 พบว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Lee และ Akoh (1996) นำ EPA มาทำปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชันกับไตรกลีเซอไรด์สายโซ่ปานกลาง (medium-chain triglyceride) เพื่อผลิตไตรกลีเซอไรด์ใหม่ (structured triglyceride) โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป IM 60 (*Mucor miehei*) พบว่าอัตราส่วนของไตรกลีเซอไรด์สายโซ่ปานกลางต่อ EPA ที่เหมาะสมที่สุด คือ 1:2 โมลต่อโมล และศึกษาต่อมาในปี 1998 ใช้ไตรคาฟรีลินทำปฏิกิริยากับ EPA และ DHA โดยเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไลเปส SP435 (*Candida rugosa*) พบว่าอัตราส่วนที่ดีที่สุด เท่ากับ 1:2 โมลต่อโมล เช่นกัน นอกจากนี้ Kosugi และ Azuma (1994) ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากเชื้อ *Rhizomucor miehei* เร่งปฏิกิริยาระหว่าง ω -3 PUFAs กับกลีเซอรอลเพื่อผลิตไตรกลีเซอไรด์ที่มีความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs สูง พบว่าอัตราส่วนของ ω -3 PUFAs ต่อกลิเซอรอล เท่ากับ 3:1 โมลต่อโมล เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด และ Cerdan และคณะ (1998) สังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส Novozyme 435 เร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันระหว่าง ω -3 PUFAs กับกลีเซอรอล พบว่าอัตราส่วนของ ω -3 PUFAs ต่อกลิเซอรอลที่ดีที่สุด คือ 3:1 โมลต่อโมล

4. การนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาซ้ำ

การนำเอนไซม์ไลเปส PS และ D ตรึงรูปกลับมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาซ้ำ เมื่อใช้ยูนิตต่อกรัมของส่วนผสมปริมาณเท่ากันในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง พบว่าเอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูปที่ผ่านการใช้ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่า เพื่อผลิตกรดไขมันอิสระ FFA-PS เมื่อนำกลับมาใช้ใหม่ได้ 4 ครั้ง (ตารางที่ 13) กิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสลดลงจาก 1.02 เป็น 0.10 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป ผลิต FFA-PS ได้ร้อยละ 70.43 ได้ % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เท่ากับร้อยละ 64.06

สำหรับเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปที่ผ่านการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันระหว่าง FFA-PS กับลอริลแอลกอฮอล์ เพื่อผลิต FFA-D นำกลับมาใช้ใหม่ได้ 6 ครั้ง (ตารางที่ 14) กิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ลดลงต่ำกว่าร้อยละ 50 ของกิจกรรมเริ่มต้น โดยลดลงจาก 1.48 เป็น 0.61 ยูนิต

ตารางที่ 12 การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ให้อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Lipozyme® IM

อัตราส่วนของ MG-D ต่อ FFA-D (โมลต่อโมล)	ปริมาณองค์ประกอบใน ส่วนผสมหลังเกิดปฏิกิริยา (ร้อยละ)				ปริมาณกรดไขมันในส่วน ไตรกลีเซอไรด์ (ร้อยละ)			% recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ TG
	TG	DG	MG	FFA	EPA	DHA	ω -3 PUFAs	
FFA-D ¹	2.23	17.01	2.55	78.12	5.44	59.01	64.45	-
MG-D ²	4.15	-	86.39	9.46	5.64	49.89	55.53	-
1:2 ไม่เติมเอนไซม์	2.37 ^a	14.01	20.40	63.22	-	-	-	-
1:1	54.41 ^b	2.54	4.76	38.30	2.99	72.75	75.74 ^a	41.21 ^a
1:2	64.40 ^c	1.35	2.03	32.22	2.56	71.55	74.11 ^b	47.73 ^b
1:3	67.28 ^d	0.99	1.33	30.39	3.17	67.96	71.13 ^c	47.86 ^b

¹, ²: FFA-D และ MG-D เริ่มต้นที่ใช้ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

^a, ^b, ^c, ^d: ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงว่าค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)

ต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรีงรูป ซึ่งสามารถเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D ได้ถึงร้อยละ 49.39 ของกรดไขมันทั้งหมด และเอนไซม์ไลเปส D ตรีงรูปที่ผ่านการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่าใน MTBE เพื่อผลิต MG-D พบว่าเมื่อนำกลับมาใช้ใหม่ได้ 6 ครั้ง (ตารางที่ 15) กิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสลดลงจาก 1.48 เป็น 0.63 หน่วยต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรีงรูป ผลิต MG-D ได้ร้อยละ 18.01 ได้ % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D เท่ากับร้อยละ 27.40 จะเห็นว่ากิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ลดลงมาก อาจเนื่องมาจากเอนไซม์สูญเสียกิจกรรมระหว่างการแยกออกจากปฏิกิริยาหรือเอนไซม์หลุดออกจากตัวพุง เพราะเอนไซม์ถูกดูดซับบนตัวพุงด้วยพันธะที่ไม่แข็งแรง นอกจากนี้ในขั้นตอนการนำเอนไซม์ตรีงรูปกลับมาใช้ซ้ำ มีการล้างเอนไซม์ตรีงรูปด้วยอะซิโตนซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ อาจมีผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ได้ทางหนึ่งด้วย ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์จะดึงน้ำออกจากโครงสร้างโปรตีนของเอนไซม์ ทำให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป (Malcata *et al.*, 1990; 1992) โดยการนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนแอสคูเรลมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาเคมีของน้ำมันซ้ำนั้นได้ผลใกล้เคียงกับการทดลองของ Al-Duri และ Yong (1997) ที่ตรีงรูปเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* (Lipase PS) และ *Humicola* (Lipolase 100L) บนแอสคูเรล EP-100 เพื่อเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดโอเลอิกกับออกทานอล (octanol) พบว่าเอนไซม์ไลเปสตรีงรูปทั้งสองชนิดสามารถนำกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำได้มากกว่า 8 ครั้ง โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ตรีงรูปเหลือมากกว่าร้อยละ 60

ตารางที่ 13 การนำเอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูปมาใช้ซ้ำในเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ใน ส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-PS

จำนวนครั้งที่นำ มาใช้ซ้ำ	ปริมาณ FFA-PS ที่ได้หลัง การเกิดปฏิกิริยา ¹ (ร้อยละ)	ปริมาณกรดไขมัน ในส่วนของ FFA-PS (ร้อยละ)			% recovery ของ ω -3 PUFAs ใน ส่วนของ FFA-PS ²	กิจกรรมเอนไซม์ ที่เหลือ (ยูนิต/มก. เอนไซม์ตรึงรูป)
		EPA	DHA	ω -3 PUFAs		
0	-	-	-	-	-	1.02 ^a
1	79.95 ^a	6.50	30.08	36.58 ^a	87.04 ^a	0.66 ^b
2	74.30 ^b	6.51	29.28	35.79 ^a	79.15 ^a	0.46 ^c
3	72.43 ^c	5.41	25.95	31.36 ^b	67.59 ^a	0.26 ^d
4	72.42 ^c	5.22	25.34	30.56 ^b	65.88 ^a	0.10 ^e

¹: เป็นค่าที่ได้จากการใช้ยูนิตของเอนไซม์ต่อกรัมส่วนผสมเท่ากันในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง

²: % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น

a, b, c, d, e: ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงว่าค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกัน

($p > 0.05$)

ตารางที่ 14 การนำเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปมาใช้ซ้ำในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ใน ส่วนกรดไขมันอิสระ FFA-D

จำนวน ครั้งที่นำ มาใช้ซ้ำ	ปริมาณ FFA-D ที่เหลือ หลังการเกิดปฏิกิริยา ¹ (ร้อยละ)	ปริมาณกรดไขมันใน ส่วนของ FFA-D (ร้อยละ)			กิจกรรมเอนไซม์ที่เหลือ (ยูนิต/มก.เอนไซม์ตรึงรูป)
		EPA	DHA	ω -3 PUFAs	
0	-	-	-	-	1.48 ^a
1	13.37 ^a	5.44	59.01	64.45 ^a	1.24 ^b
2	17.46 ^b	5.51	58.44	63.95 ^b	1.09 ^c
3	18.12 ^b	5.59	53.77	59.36 ^c	0.98 ^d
4	19.57 ^c	5.52	48.50	54.02 ^d	0.85 ^e
5	19.74 ^c	5.42	46.64	52.06 ^e	0.75 ^f
6	21.44 ^d	5.38	44.01	49.39 ^f	0.61 ^g

¹: เป็นค่าที่ได้จากการใช้ยูนิตของเอนไซม์ต่อกรัมส่วนผสมเท่ากันในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง

a, b, c, d, e, f, g: ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงว่าค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกัน

($p > 0.05$)

ตารางที่ 15 การนำเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปมาใช้ซ้ำในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ใน ส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ MG-D

จำนวนครั้งที่นำ มาใช้ซ้ำ	ปริมาณ MG-D ที่ได้หลัง การเกิดปฏิกิริยา ¹ (ร้อยละ)	ปริมาณกรดไขมัน ในส่วนของ MG-D (ร้อยละ)			% recovery ของ ω -3 PUFAs ใน ส่วนของ FFA-PS ²	กิจกรรมเอนไซม์ ที่เหลือ (ยูนิต/มก. เอนไซม์ตรึงรูป)
		EPA	DHA	ω -3 PUFAs		
0	-	-	-	-	-	1.48 ^a
1	19.39 ^a	6.72	49.54	56.26 ^a	32.47 ^a	1.34 ^b
2	19.78 ^{ab}	6.84	48.33	55.17 ^b	32.49 ^a	1.12 ^c
3	18.87 ^b	6.72	49.40	56.12 ^a	31.53 ^b	1.04 ^d
4	18.22 ^c	6.58	48.71	55.29 ^b	30.53 ^c	0.92 ^e
5	17.95 ^c	6.51	45.19	51.70 ^c	27.63 ^d	0.77 ^f
6	18.01 ^c	6.40	44.71	51.11 ^d	27.40 ^e	0.63 ^g

¹: เป็นค่าที่ได้จากการใช้ยูนิตของเอนไซม์ต่อกรัมส่วนผสมเท่ากันในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง

²: % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น

a b c d e f g : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงว่าค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกัน

($p > 0.05$)

บทที่ 4

สรุป

1. การทำบริสุทธิ์น้ำมันปลาที่ได้อาจจากการบีบอัดส่วนหัวของปลาทูน่าพันธุ์ Skipjack ของบริษัทโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต จำกัด (มหาชน) พบว่าน้ำมันปลาที่ได้อมีองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์สูงสุด ร้อยละ 99 ซึ่งมีปริมาณ EPA และ DHA เท่ากับ ร้อยละ 6.42 และ 27.18 ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ

2. การศึกษากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปลาโอลิโนของเอนไซม์ไลเปส PS และ D พบว่าเอนไซม์ไลเปส PS และ D มีกิจกรรมการย่อยสลาย เท่ากับ 6.40 และ 406.92 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เอนไซม์ มีปริมาณโปรตีน 0.07 และ 1.10 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ และกิจกรรมจำเพาะ เท่ากับ 96.86 และ 370.47 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

3. การตรึงเอนไซม์ไลเปส PS และ D โดยการดูดซับกับตัวพุง 3 ชนิด คือ แอคคูเรล ซีไลท์ และซิลิกาเจล พบว่าการตรึงเอนไซม์ไลเปส PS และ D บนแอคคูเรลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึง เท่ากับ 0.94 และ 1.45 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป และกิจกรรมการยึดเกาะ เท่ากับร้อยละ 18.80 และ 3.56 ตามลำดับ

4. สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-PS โดยใช้เอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่า คือใช้น้ำมันปลาทูน่าและน้ำ ในอัตราส่วน 1.5:1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก (ปริมาณน้ำร้อยละ 40 ของน้ำหนักส่วนผสม) เอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูป 30 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม กวนตลอดเวลาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเกิด FFA-PS เท่ากับร้อยละ 79.95 โดยมีปริมาณ ω -3 PUFAs เท่ากับร้อยละ 36.58 ซึ่งคิดเป็น % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น เท่ากับร้อยละ 87.04

5. สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-D โดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันระหว่าง FFA-PS และลอริลแอลกอฮอล์ คือ FFA-PS และลอริลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1:3 โมลต่อโมล ปริมาณน้ำร้อยละ 20 ของน้ำหนักส่วนผสม เอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูป 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสม กวนตลอดเวลาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำให้ได้ปริมาณ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-D เท่ากับร้อยละ 64.45 ของกรดไขมันทั้งหมด

6. สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ MG-D โดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปลาทูน่า คือ น้ำมันปลาทูน่าและน้ำ ในอัตราส่วน 1:1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก (ปริมาณน้ำร้อยละ 50 ของน้ำหนักส่วนผสม) ละลายใน Methyl-tert-Buthyl-Ether ในอัตราส่วน 1:1 น้ำหนักต่อปริมาตร เอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูป 100 ยูนิตต่อกรัมส่วนผสมน้ำมันปลาทูน่าและน้ำ กวนตลอดเวลาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเกิด MG-D เท่ากับร้อยละ 19.89 โดยมีปริมาณ ω -3 PUFAs เท่ากับร้อยละ 56.57 ซึ่งคิดเป็น % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D เทียบกับ ω -3 PUFAs ในน้ำมันปลาทูน่าเริ่มต้น เท่ากับร้อยละ 33.49

7. การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ให้อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ พบว่าเมื่อใช้กรดไขมันอิสระ FFA-D และโมโนกลีเซอไรด์ MG-D ในอัตราส่วน 1:2 โมลต่อโมล น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ละลายในเฮกเซน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Lipozyme® IM ร้อยละ 10 ของน้ำหนัก FFA-D และ MG-D กวนตลอดเวลาด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตไตรกลีเซอไรด์ได้ร้อยละ 64.40 ซึ่งมีปริมาณ ω -3 PUFAs ร้อยละ 74.11 ของกรดไขมันทั้งหมด คิดเป็น % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของไตรกลีเซอไรด์ เท่ากับร้อยละ 47.73

8. การนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาซ้ำ เมื่อใช้ยูนิตของเอนไซม์ต่อกรัมส่วนผสมเท่ากันในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง พบว่าเอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูปสามารถนำกลับมาใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS เป็นครั้งที่ 4 ได้ % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS ต่ำสุดร้อยละ 64.06 และคงเหลือกิจกรรมเท่ากับ 0.10 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป ส่วนเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปสามารถนำกลับมาใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D ได้ถึง 6 ครั้ง จึงจะทำให้กิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปลดลงต่ำกว่าร้อยละ 50 ของกิจกรรมเริ่มต้นเท่ากับ 0.61 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป โดยได้ปริมาณ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D เท่ากับร้อยละ 49.39 ของกรดไขมันทั้งหมด และนำเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปมาใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D ได้ 6 ครั้งเช่นกัน ได้ % recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D ต่ำสุดร้อยละ 27.40 กิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปจึงลดลงเหลือ 0.63 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ให้อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดไขมันอิสระ FFA-D กับกลีเซอรอลเพื่อลดขั้นตอนในการผลิต
2. ควรมีการศึกษาชนิดของกรดไขมันที่ตำแหน่งต่างๆ ในโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ให้อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ เพื่อให้รู้ว่าในโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ที่ได้มี ω -3 PUFAs ทุกตำแหน่งหรือไม่
3. ควรมีการศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ โดยให้เอนไซม์ไลเปส PS เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย ω -3 PUFAs ออกจากโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันปลาแล้วให้เอนไซม์ไลเปส D เร่งปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีสของกรดไขมันอิสระที่อยู่ในส่วนผสมของปฏิกิริยานั้นกับลอริลแอลกอฮอล์ (ไม่ต้องสกัดส่วนของกรดไขมันอิสระออกมาก่อนทำปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีส) ซึ่งเอนไซม์ไลเปส D จะเร่งปฏิกิริยาการเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดไขมันที่ไม่ใช่ ω -3 PUFAs กับลอริลแอลกอฮอล์ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเอสเทอร์ขึ้น และในส่วนผสมปฏิกิริยาสุดท้ายเหลือ ω -3 PUFAs ในรูปที่เป็นกรดไขมันอิสระอยู่ แล้วจึงสกัด ω -3 PUFAs ในรูปที่เป็นกรดไขมันอิสระออกมา เปรียบเทียบกับการทดลองการเพิ่มความเข้มข้น ω -3 PUFAs ในรูปของกรดไขมันอิสระซึ่งต้องสกัดกรดไขมันอิสระออกจากส่วนผสมปฏิกิริยาถึง 2 ครั้ง

เอกสารอ้างอิง

- ประดิษฐ์ มีสุข. 2538. เคมีของลิพิด. ใน *ชีวเคมีเบื้องต้น (เคมีชีวิต)*. หน้า 75-94. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- ประหยัด โกมารทัต. 2542. ไซมัน. ใน *ชีวเคมี*. (มนตรี จุฬาวัดมนทล และประหยัด โกมารทัต, บรรณาธิการ), หน้า 55-69. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.
- วุฒิชัย พิชัยยุทธ. 2540. การย่อยสลายน้ำมันปลาโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกต้อง. *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต*. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พรทิพย์ แซ่เตีย. 2537. การศึกษาเบื้องต้นในการใช้เศษเหลือของอุตสาหกรรมปลาทุ่นำมาประกอบเพื่อผลิตน้ำมันปลา. *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต*. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุมาลัย ศรีกำไลทอง, เรวดี นาคดี, จีระวัฒน์ เขียมวัฒน์, สมนึก อาษา, พิศมัย เจนวนิชปัญจกุล และปาริชาติ หลายชูไทย. 2538. การพัฒนาเพื่อเพิ่มมูลค่าของเหลือใช้ในอุตสาหกรรมปลาทุ่นำมาประกอบ:การผลิต PUFA จากวัสดุเศษเหลือใช้จากอุตสาหกรรมปลาทุ่นำมาประกอบ. รายงานฉบับที่ 1 เรื่องกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดโอเมก้า-3 จากน้ำนิ่งปลาของอุตสาหกรรมปลาทุ่นำมาประกอบ. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.
- สมบัติ รุ่งศิลป์. 2541. การผลิตน้ำมันปลาที่มีสารโอเมก้า 3 พูฟา จากน้ำนิ่งปลาทุ่นำมา. *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต*. สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อาภัสสร ชมิดท์. 2537. ลิพิด. ใน *ชีวเคมี*. หน้า 187-217. เคยูเพลสส์. กรุงเทพฯ.
- Ackman, R.G. 1989. Fatty acid. In *Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils*. (Ackman, R.G., ed.). p. 145-178. CRC Press Inc. Boca Raton.
- Adachi, S., Okumura, K., Ota, Y. and Mankura, M. 1993. Acidolysis of sardine oil by lipase to concentrate eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in glycerides. *Ferment. Bioeng.* 75(4): 259-264.
- Aggelousis, A. and Lazos, E.S. 1991. Fatty acid composition of lipids from eight freshwater fish species from Greece. *J. Food Comp. Anal.* 4: 68-76.
- Al-Duri, B. and Yong, Y. P. 1997. Characterization of the equilibrium behaviour of Lipase PS (from *Pseudomonas*) and Lipolase 100L (from *Humicola*) onto Accurel EP100. *J. Molecular Catalysis B:Enzymatic* 3(1-4): 177-188.

- A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemists 15th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc. Virginia.
- Balcao, V.M., Paiva, A.L. and Malcata, F.X. 1996. Bioreactors with immobilized lipase: state of art. *Enzyme Microb. Technol.* 18: 392-416.
- Bosley, J. A. and Peilow, A. D. 1997. Immobilization of lipases on porous polypropylene : reduction in esterification efficiency at low loading. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74(2): 107-111.
- Brady, C. Metcalfe, L. Staboszewski, D. and Frank, D. 1988. Lipase immobilized on hydrophobic microporous support for the hydrolysis of fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65(6): 917-921.
- Cerdan, L. E., Medina, A. R., Gimenez, A. G., Gonzalez, M. J. I. and Grima, E. M. 1998. Synthesis of polyunsaturated fatty acid enriched triglycerides by lipase-catalyzed esterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75(10): 1329-1337.
- Chetty, N., Reavis, S.C., Immelman, A.R., Atkinson, P.M. and Van-As, J.G. 1989. Fatty acid composition of some South Africa fresh-water fish. *South Africa Med.* 76(7): 368-370.
- Connor, W.E., Neuringer, M. and Lin, D.S. 1990. Dietary effects on brain fatty acid composition : the reveribility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexaenoic acid in the brain, erythrocytes and plasma of rhesus monkeys. *J. Lipid Res.* 31: 237-247.
- Haraldsson, G.G., Kristinsson, S., Sigurdardottir, R., Gudmundsson. G.G. and Breivic, H. 1997. The preparation of concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase-catalyzed transesterification of fish oil with ethanol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74(11): 1419-1424.
- Hoegh, I., Patkar, S., Halkier, T. and Hansen. M. T. 1995. Two lipases from *Candida antarctica*-cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Can. J. Botany.* 73: S869-S875.
- Karahadian, C. and Lindsay, R.C. 1989. Composition of n-3 oils from some Great Lakes freshwater fish. *J. Food Comp. Anal.* 2: 13-21.

- Kazlauskas, R. J. and Bornscheuer, U. T. 1997. Biotransformation with lipases. *In* Biotechnology VIII : Biotransformations. (Rehm, H. J., Reed, G., Puhler, A., Stadler P. J. M. and Kelly, D. R., eds.). p. 226. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim.
- Kennedy, J.F. and Cabral, J.M.S. 1987. Enzyme Immobilization. *In* Biotechnology VIIa : Enzyme Technology. (Kennedy, J. F., ed.). p. 347-404. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim.
- Kinsella, J.E. 1986. Food components with potential therapeutic benefits:the *n*-3 polyunsaturated fatty acids of fish oils. *Food Technol.* 40(2): 89-96.
- Kinsella, J.E. 1988. Food lipids and fatty acids importance in food quality, nutrition and health. *Food Technol.* 42(10): 124-145.
- Kosugi, Y. and Azuma, N. 1994. Synthesis of triacylglycerol from polyunsaturated fatty acid by immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71(12): 1397-1403.
- Kwon, D. Y. and Rhee, J. S. 1986. A simple and rapid calorimetric method for determination of free fatty acid for lipase assay. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63(2): 89-95.
- Lee, S. Y. and Rhee, J. S. 1993. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 617-623.
- Lee, K. T. and Akoh, C. C. 1996. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73 (5): 611-615.
- Lee, K. T. and Akoh, C. C. 1998. Characterization of enzymatically synthesized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexaenoic and caprylic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75(4): 495-499.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. A. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Macrae, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oil and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60(2): 291-293.

- Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G. and Amundson, C.H. 1990. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils : a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67(12): 890-910.
- Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G. and Amundson, C.H. 1992. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 14(6): 426-446.
- Montero, S., Blanco, A., Virto, M. D., Landata, L. C., Agud, I., Solozabal, R., Lascarry, J. M., Robobales, M., Lama, M. J. and Serra, M. J. 1993. Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 239-247.
- Moore, S.R. and McNeill, G.P. 1996. Production of triglycerides enriched in long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73 (11): 1409-1414.
- Nichols, D.S., Williams, D., Dunstan, G.A., Nichols, P.D. and Volkman, J.K. 1994. Fatty acid composition of Antractic and temperate fish of commercial interest. *Comp. Biochem. Physiol.* 107(2): 357-363.
- Perrin, D. D. and Dempsey, B. 1974. Buffer for pH and Metal Ion Control. Chapman and Hall. London
- Ruckenstein, E. and Wang, X. 1993. Lipase immobilized on hydrophobic porous polymer supports prepared by concentrated emulsion polymerization and their activity in the hydrolysis of triglycerides. *Biotechnol. Bioeng.* 42(7): 821-828.
- Schmid, U., Borncheuer, U. T., Soumanou, M. M., MaNeill, G. P. and Schmid, R. D. 1999. Highly selective synthesis of 1,3-oleoyl-2-palmitoylglycerol by lipase catalysis. *Biotechnol. Bioeng.* 64(6): 678-684.
- Schwimmer, S. 1981. Source Book of Food Enzymology. The AVI Publishing Company, Inc. Westport Connecticut..
- Shimada, Y., Maruyama, K., Okazaki, S., Nakamaru, M., Sugihara, A. and Tominaga, Y. 1994. Enrichment of polyunsaturated fatty acids with *Geotrichum candidum* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71(9): 951-954.

- Shimada, Y., Maruyama, S., Nakamaru, M., Nakamaru, S., Sugihara, A. and Tominaga, Y. 1995. Selective hydrolysis of polyunsaturated fatty acid-containing oil with *Geotrichum candidum* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*72(12): 1577-1581.
- Shimada, Y., Maruyama, K., Sugihara, A., Moriyama, S. and Tominaga, Y. 1997a. Purification of docosahexaenoic acid from tuna oil by a two-step enzymatic methods:hydrolysis and selective esterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.*74(11): 1441-1446.
- Shimada, Y., Maruyama, K., Sugihara, A., Sugihara, A., Baba, T., Komemushi, S., Moriyama, S. and Tominaga, Y. 1998. Purification of ethyl docosahexaenoate by selective alcoholysis of fatty acid ethyl esters with immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*75(11): 1565-1571.
- Shimada, Y., Sugihara, A., Nakano, H., Kuramoto, T., Nagao, T., Gemba, M. and Tominaga, Y. 1997b. Purification of docosahexaenoic acid by selective esterification of fatty acid from tuna oil with *Rhizopus delemar* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*74(2): 97-101.
- Shimada, Y., Sugihara, A., Yodono, S., Nagao, T., Maruyama, K., Nakano, H., Komemushi, S. and Tominaga, Y. 1997c. Enrichment of ethyl docosahexaenoate by selective alcoholysis with immobilized *Rhizopus delemar* lipase. *Ferment. Bioeng.* 84(2): 138-143.
- Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T. and Schmid, R. D. 1998. Two-step enzymatic reaction for the synthesis of pure structured triacylglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75(6): 703-710.
- Stansby, M.E. 1990. Classes of lipids in fish. *In* Fish Oils in Nutrition. (Stansby, M.E., ed.). p. 3-5. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Suzuki, H. 1993. Eat fish for good brain. *INFOFISH International* 4: 23-26.
- Swern, D. 1979. Structure and composition of fats and oils. *In* Bailey's Industrial Oil and Fat Products 3rd ed. (Swern, D., ed.). p. 3-53. Interscience Publishers. New York.

- Tanaka, Y., Hirano, J. and Funada, T. 1992. Concentration of docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of fish oil by *Candida cylindracea* lipase. J. Am. Oil Chem. Soc. 69(12): 1210-1214.
- Veeraragavan, K. and Gibbs, B. F. 1989. Detection and partial purification of two lipase from *Candida rugosa*. Biotech. Lett. 11:345-348.
- Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipid industry : an engineering overview. J. Am. Oil Chem. Soc.64(2): 1657-1661.
- Yongmanitchai, W. and Ward, O.P. 1989. Omega-3 fatty acid : alternative sources of production. Process Biochem.24(4): 117-125.
- Zlatanov, S. and Sagredos, A.N. 1993. The fatty acids composition of some important Mediterranean fish species. Fat Sci. Technol. 95(2): 66-69.
- Zuyi, L. and Ward, O.P. 1993. Lipase-catalyzed alcoholysis to concentrate the n-3 polyunsaturated fatty acid of cod liver oil. Enzyme Microb. Technol. 15: 601-606.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การทำบริสุทธิ์น้ำมันปลาทูน่าโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของสมบัติ รุ่งศิลป์ (2541)

1. การกำจัดสารเหนียว โดยเติมกรดซิตริกร้อยละ 15 ลงในน้ำมันปลาทูน่า เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำปริมาณร้อยละ 2 เป็นเวลา 20 นาที นำไปเหวี่ยงแยกสารเหนียวด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำมันที่อยู่ชั้นบนไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2. การทำน้ำมันให้เป็นกลาง โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 11.60 (16 องศาโบเม) ในปริมาณมากเกินไปร้อยละ 0.5 ทำปฏิกิริยาสบูเป็นเวลา 5 นาที ปรับอุณหภูมิน้ำมันเป็น 70 องศาเซลเซียส ทันทัน จากนั้นปล่อยให้สบู่ตกตะกอนแยกตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 10 ชั่วโมง นำน้ำมันที่ได้ไปเหวี่ยงแยกตะกอนสบู่อีกครั้งด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำมันที่อยู่ชั้นบนไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3. การเติมด่างซ้ำ โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 28.72 (40 องศาโบเม) ปริมาณร้อยละ 3 ทำปฏิกิริยาสบูเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำเช่นเดียวกับการทำให้เป็นกลาง แล้วเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที นำน้ำมันที่ได้ไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำมันที่อยู่ชั้นบนไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

4. การฟอกสีน้ำมัน โดยเติมดินฟอกสีชนิดแอกติเวตเดอเอิร์ทร้อยละ 5 ลงในน้ำมันที่ได้จากข้อ 3 เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ที่ความดันสูญญากาศ 27 นิ้วปรอท ปล่อยให้น้ำมันมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วกรองด้วยเครื่องกรองสูญญากาศ

5. การแยกส่วนไขมัน โดยเติมตัวทำละลายเอ็กเซนลงในน้ำมันที่ผ่านการกรองจากข้อ 4 ในสัดส่วนน้ำมันต่อเอ็กเซน 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองผลึกสเตอรินและระเหยเอ็กเซนออกจากน้ำมัน (โอเลอิน) ด้วย Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

6. การกำจัดกลิ่น โดยใช้อุณหภูมิในการกำจัดกลิ่นของน้ำมันปลาทูน่าที่ 190 องศาเซลเซียส ความดัน 27 นิ้วปรอท พร้อมพ่นไอน้ำลงในน้ำมันในปริมาณร้อยละ 3 ต่อชั่วโมง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยให้แห้ง

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไลเปส ตามวิธีการของ Lowry และคณะ (Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลาย A : คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
2. สารละลาย B : โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrate. $4\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
3. สารละลาย C : โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
4. Folin-Ciocalteu reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลาย WS1 และ WS2 ใหม่ทุกครั้งก่อนใช้ โดย

WS1 : สารละลายผสมของสารละลาย A : สารละลาย B : สารละลาย C ในอัตราส่วน 1:1:98 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร)

WS2 : สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent เจือจางกับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

2. เติมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นในช่วงที่เหมาะสม (5-100 ไมโครกรัม) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาด 5.0 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลาย WS1 ปริมาตร 2.1 มิลลิลิตร ปั่นผสม แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที

4. เติมสารละลาย WS2 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ปั่นผสมทันที แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

5. นำสารละลายที่ได้มาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยทำ blank เช่นเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง แล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน

การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน (BSA)

1. ชั่ง bovine serum albumin (BSA) น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น โดยค่อยๆ เติมน้ำกลั่นเพื่อชะฟองที่เกิดขึ้น เมื่อชะฟองหมดปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร จะได้ BSA ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. นำสารละลายที่ได้ในข้อ 1 ปริมาตร 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

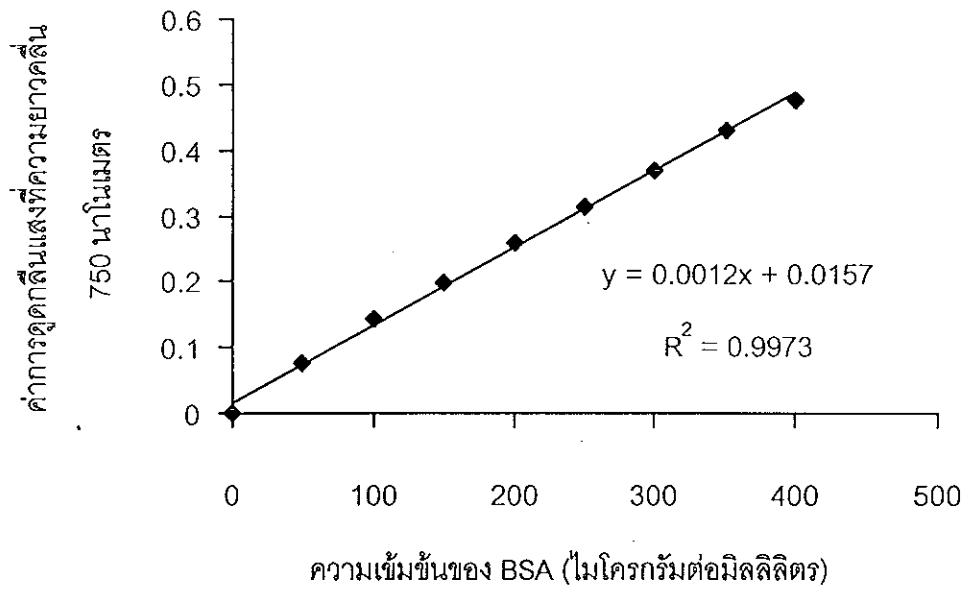
3. นำสารละลายที่ได้ในข้อ 2 ความเข้มข้นละ 0.2 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดขนาด 5 มิลลิลิตร

4. เติมสารละลาย WS1 ปริมาตร 2.1 มิลลิลิตร บั่นผสม แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที

5. เติมสารละลาย WS2 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร บั่นผสมทันที แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

6. นำสารละลายที่ได้มาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยทำ blank เช่นเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

7. นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีน (BSA) แสดงดังภาพภาคผนวก ข1



ภาพภาคผนวก ข1 กราฟมาตรฐานโปรตีน

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดปาล์มิติก

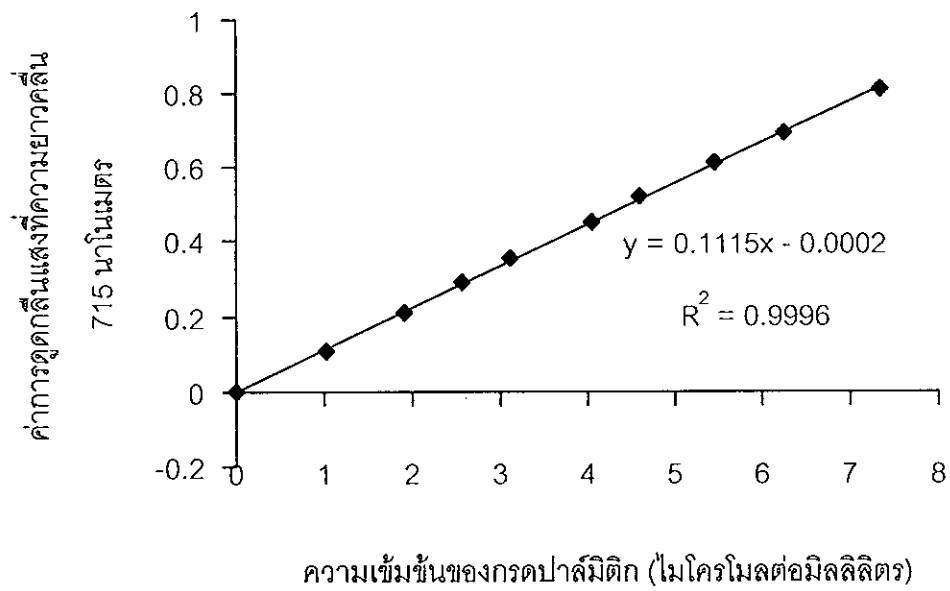
สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. กรดปาล์มิติก
2. ไอโซออกเทน
3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 (ภาคผนวก ค)
4. สารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

เตรียมโดยชั่ง cupric acetate ($C_4H_6CuO_4 \cdot H_2O$) 50.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 850 มิลลิลิตร กรองส่วนที่ไม่ละลายออก ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.1 ด้วยโพริติน และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งกรดปาล์มิติกที่มีความบริสุทธิ์สูงให้มีน้ำหนักแน่นอนตั้งแต่ 0-10 มิลลิกรัม ละลายในไอโซออกเทนปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยในการละลาย
2. นำสารละลายกรดปาล์มิติกที่เตรียมได้ในข้อ 1 ความเข้มข้นละ 1.0 มิลลิลิตร เติมด้วยสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ปั่นผสมอย่างรวดเร็ว ทิ้งให้แยกชั้น
3. ดูดสารละลายชั้นบนวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร โดยใช้ไอโซออกเทนเป็น blank
4. นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดปาล์มิติก แสดงดังภาพภาคผนวก ข2



ภาพภาคผนวก ข2 กราฟมาตรฐานกรดพอลีสตีติก

3. การเตรียมสารละลายเมทิลเอสเทอร์ (A.O.A.C., 1990)

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเมทิลเอสเทอร์

1. ไอโซออกเทน
2. สารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์ในเมทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 20
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้) (ภาคผนวก ค)
4. สารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว
5. ก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์

วิธีการเตรียมเมทิลเอสเทอร์

1. ชั่งตัวอย่างน้ำมันปลาทูล่า 25 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์และปิดฝาหลอดให้แน่น บั่นผสมแล้วแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที
2. ทำให้เย็นทันทีแล้วเติมสารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์ในเมทานอล ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์และปิดฝาหลอดให้แน่น บั่นผสมแล้วแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที
3. ทำให้เย็นทันทีโดยให้มีอุณหภูมิประมาณ 30-40 องศาเซลเซียส แล้วเติมไอโซออกเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร บั่นผสมเป็นเวลา 30 วินาที
4. เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ทิ้งที่ บั่นผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น
5. ดูดสารละลายชั้นบน (ส่วนของไอโซออกเทน) ใส่ใน injection vial tube ที่สะอาดและแห้ง
6. สกัดสารละลายชั้นล่างซ้ำอีกครั้งด้วยไอโซออกเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร บั่นผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายชั้นบนที่ได้ใส่ใน injection vial tube เดียวกับที่ได้จากข้อ 5 เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์และปิดฝาหลอดให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

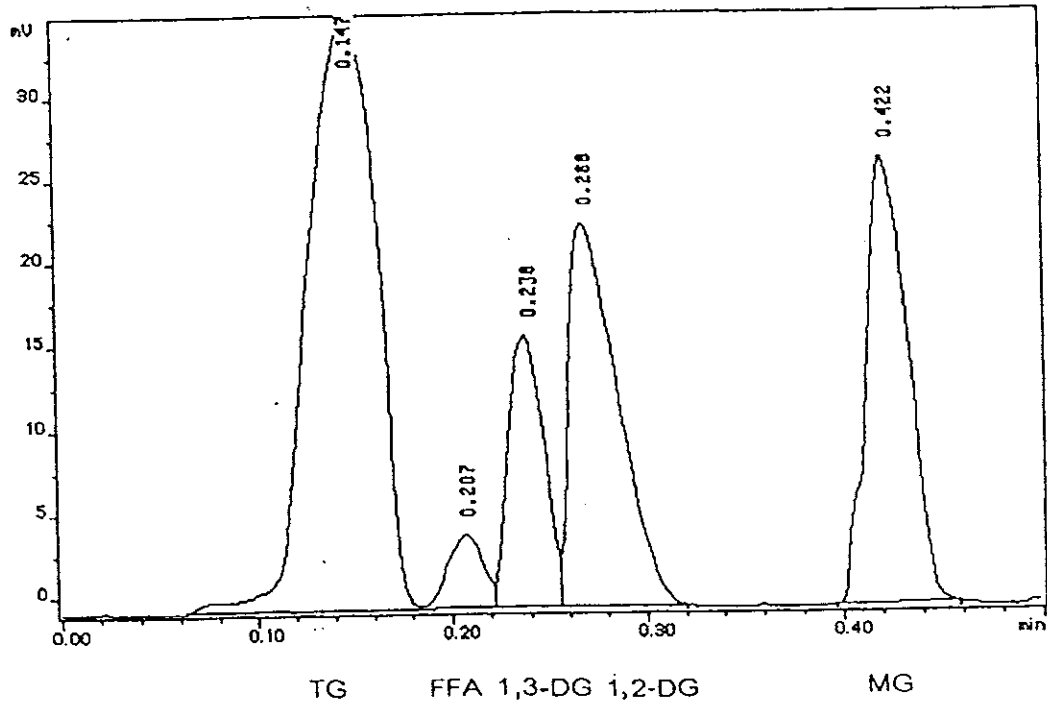
4. การหาค่ามาตรฐานของสารประกอบกลีเซอไรด์

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารประกอบกลีเซอไรด์มาตรฐาน (tripalmitin, triolein, dipalmitin, diolein, monopalmitin, monoolein, palmitic acid และ oleic acid)
2. กรดบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 3
3. สารละลายผสมของเบนซีน : คลอโรฟอร์ม : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 50:20:0.7 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร)

วิธีวิเคราะห์

1. ละลายสารประกอบกลีเซอไรด์มาตรฐานความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยคลอโรฟอร์ม และเจือจางเป็น 100 เท่า
2. เตรียม quartz rods (silica gel powdre coated Chromarod S-III) โดยแช่ในสารละลายกรดบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 5 นาที นำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปทำ blank scan ด้วย TLC/FID analyzer ภายใต้สภาวะ 30 วินาทีต่อสแกน อัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจน 160 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการไหลของอากาศ 2,000 มิลลิลิตรต่อนาที
3. หยดสารละลายกลีเซอไรด์มาตรฐานบน quartz rods ประมาณ 1 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 นาที นำ quartz rods ไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วยเบนซีน : คลอโรฟอร์ม : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 50:20:0.7 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) (Shimada *et al*, 1997a) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 10 เซนติเมตร
4. นำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมา สแกน ภายใต้สภาวะเดียวกันกับ blank scan
5. อ่านผลการวิเคราะห์จากโปรแกรม ChromStar light โดยผลการทดลองแสดงในรูปแบบเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แต่ละ peak ดังภาพผนวก ข3

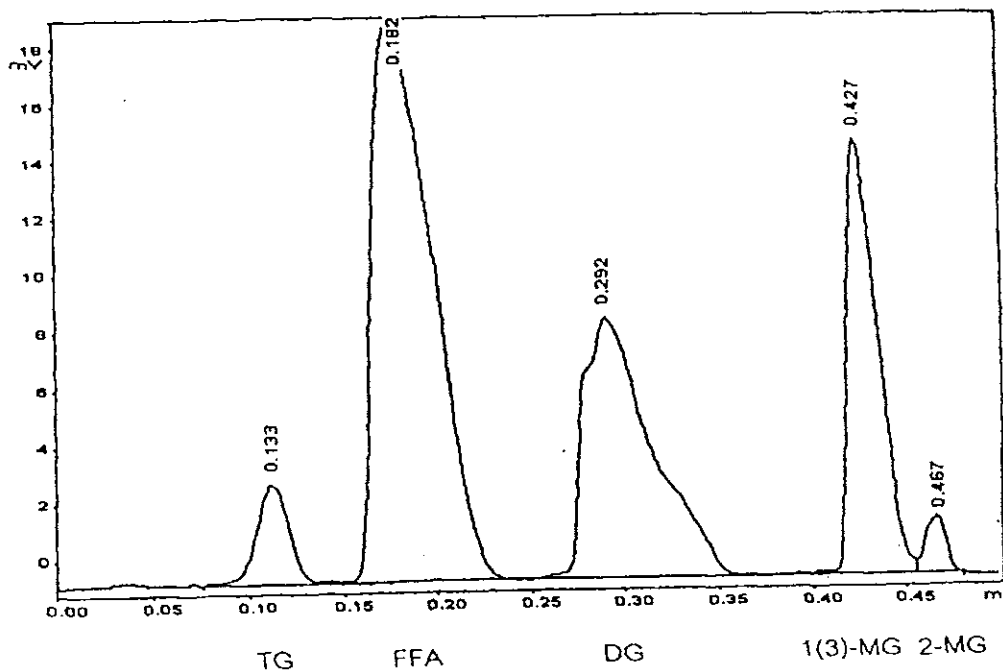


Peak No.	Ret. Time (min)	Pk. Start (min)	Pk. End (min)	Area	Height (mV)	Area (%)
1	0.147	0.063	0.183	45735	35.32	45.41
2	0.207	0.183	0.222	2965	4.43	2.94
3	0.238	0.222	0.255	10575	16.25	10.50
4	0.268	0.255	0.320	21131	23.06	20.98
5	0.422	0.397	0.458	20306	26.88	20.16
Totals:				100713	105.95	100.00

ภาพภาคผนวก ข3 ค่า Retention Time ของสารประกอบกลีเซอไรด์มาตรฐาน

5. การหาค่ามาตรฐานขององค์ประกอบกลีเซอไรด์ในน้ำมันปลาทูน่า

การหาค่ามาตรฐานขององค์ประกอบกลีเซอไรด์ในน้ำมันปลาทูน่า ทำการทดลองเช่นเดียวกับการหาค่ามาตรฐานขององค์ประกอบกลีเซอไรด์มาตรฐาน แต่ใช้น้ำมันปลาทูน่าที่ผ่านการย่อยสลายแบบไม่สมบูรณ์ (partial hydrolysis) แทนการใช้สารประกอบกลีเซอไรด์มาตรฐาน ผลการทดลองแสดงในรูปเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แต่ละ peak ดังภาพผนวก ข4

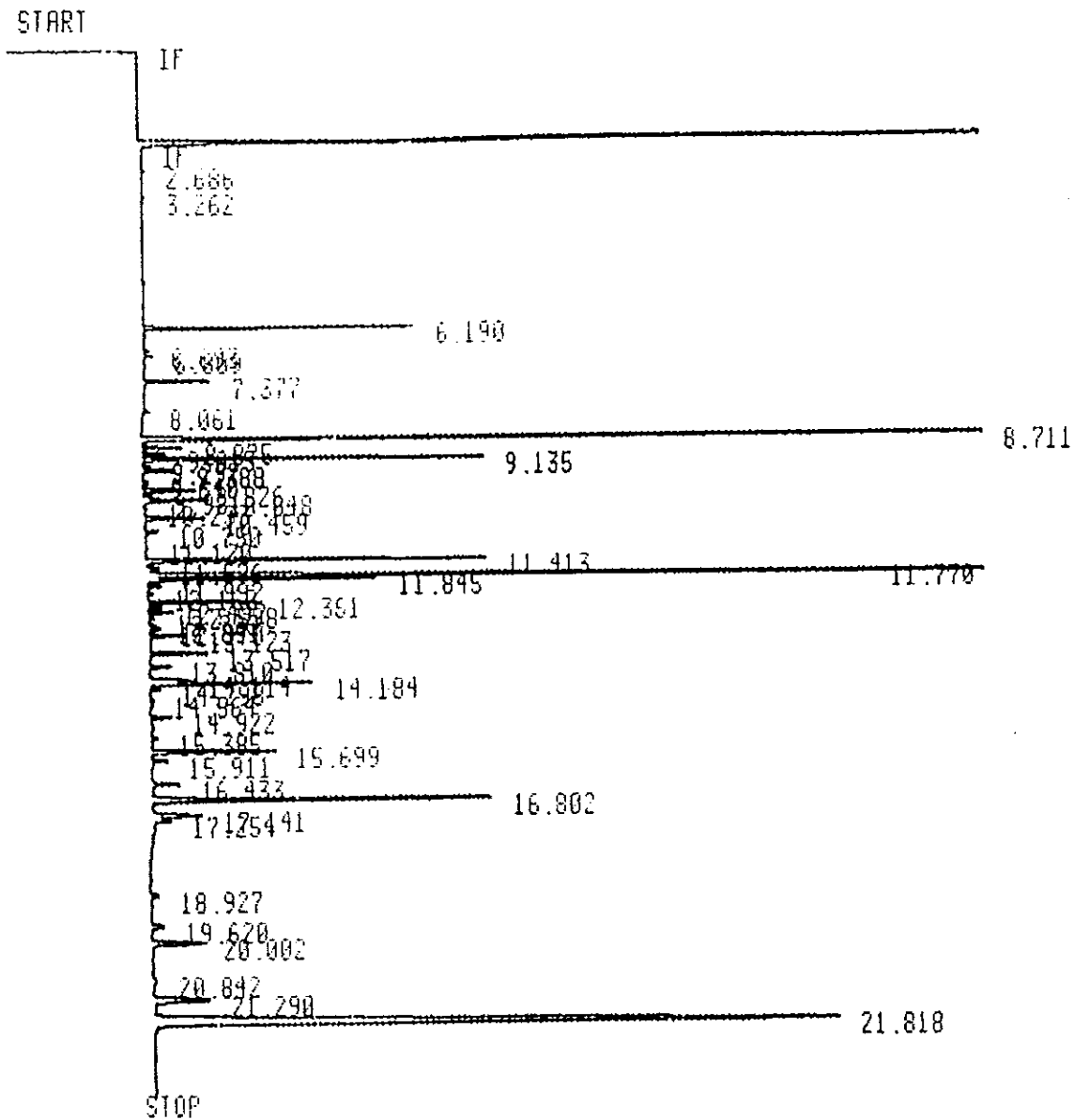


Peak No.	Ret. Time (min)	Pk. Start (min)	Pk. End (min)	Area	Height (mV)	Area (%)
1	0.113	0.075	0.147	2169	3.43	4.65
2	0.182	0.147	0.247	22573	19.75	48.40
3	0.292	0.247	0.380	12083	9.16	25.91
4	0.427	0.380	0.455	9045	15.18	19.40
5	0.467	0.455	0.480	765	2.05	1.64
Totals:				46634	49.58	100.00

ภาพภาคผนวก ข4 ค่า Retention Time ขององค์ประกอบกลีเซอไรด์ในน้ำมันปลาทูน่า

6. การหาค่ามาตรฐานขององค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่า

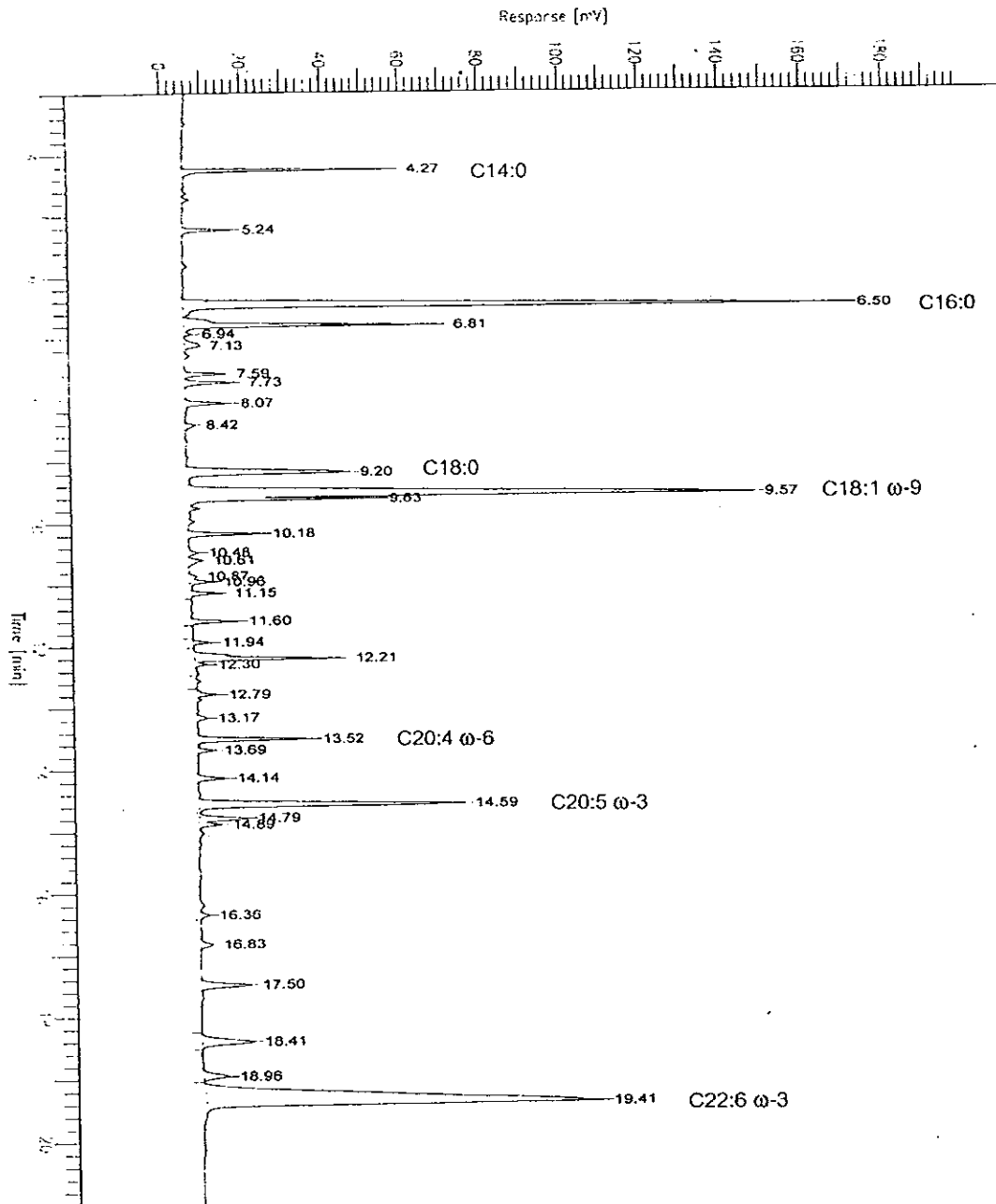
การหาค่ามาตรฐานขององค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่าในการทดลองนี้ใช้การหาค่ามาตรฐานเชิงคุณภาพ (Qualitative Standard) โดยใช้น้ำมันปลาทูน่าและค่ามาตรฐานขององค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่าของ Shimada และคณะ (1997a) (ภาพภาคผนวก ข5) ทำการทดลองโดยเตรียมน้ำมันปลาทูน่าให้อยู่ในรูปของเมทิลเอสเทอร์ แล้ววิเคราะห์ด้วย GC/FID analyzer ที่มีคอลัมน์แบบ Fused silica capillary DF 0.25 ไมโครเมตร ชนิด PERMABOND-FFAP ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 25 เมตรให้มีสภาวะการทำงานดังนี้ อุณหภูมิของ injector เท่ากับ 245 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มจาก 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5 นาที เพิ่มขึ้นเป็น 170 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มเป็น 195 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที หลังจากนั้นเพิ่มเป็น 215 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงที่ที่ 215 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12.5 นาที และอุณหภูมิของ detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีอัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม 25 เซนติเมตรต่อนาที และ Split ratio เท่ากับ 100:1 (Shimada *et al.*, 1997) เมื่อ GC/FID analyzer พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ จีดีสารละลายเมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันปลาทูน่า ปริมาตร 1-10 ไมโครลิตร ที่ injector port โดย GC/FID analyzer มีระบบสแกนโดยอัตโนมัติ ผลการทดลองคำนวณได้จากพื้นที่ของ peak ซึ่งเปรียบเทียบในรูปเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ของแต่ละ peak ผลการทดลองแสดงในรูปเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แต่ละ peak ดังภาพผนวก ข6



ภาพภาคผนวก ข5 ค่า Retention Time ขององค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่าของ Shimada และคณะ (1997a)

Peak No.	Ret. Time(min)	Area	Type	Width	Area(%)	Fatty Acid
1	6.190	20337	BB	0.034	2.9058	C14:0
2	7.377	5613	BV	0.038	0.8020	
3	8.711	124589	BB	0.045	17.8016	C16:0
4	8.875	3468	BV	0.038	0.4955	
5	9.015	2014	VB	0.039	0.2878	
6	9.135	29393	BB	0.040	4.1997	C16:1
7	9.388	3607	VV	0.049	0.5154	
8	9.826	6339	BV	0.055	0.9157	
9	10.048	7273	VB	0.050	1.0392	C17:0
10	10.459	6277	VV	0.047	0.8969	
11	10.750	2021	VV	0.067	0.2888	
12	11.413	32174	BB	0.044	4.5971	C18:0
13	11.770	127370	VV	0.045	18.1989	C18:1 Ω-9
14	11.845	17269	VV	0.034	2.4674	C18:2 Ω-7
15	12.361	8746	VB	0.037	1.2496	C18:2 Ω-6
16	12.598	2224	BV	0.039	0.3178	
17	13.123	3186	BV	0.038	0.4552	
18	13.517	5341	VV	0.042	0.7631	
19	13.810	2294	BB	0.048	0.3278	
20	14.114	4786	BV	0.056	0.6838	
21	14.184	17301	VV	0.048	2.4720	
22	14.922	2483	BV	0.052	0.3548	
23	15.699	4587	VV	0.053	2.0842	C20:4 Ω-6
24	15.911	2133	VV	0.057	0.3048	
25	16.433	3888	BV	0.062	0.5555	
26	16.802	44823	BB	0.061	6.4044	C20:5 Ω-3
27	17.141	8741	BV	0.079	1.2489	
28	17.254	3265	VV	0.073	0.4665	
29	19.620	2183	BV	0.077	0.3119	
30	20.002	8790	BB	0.080	1.2559	
31	21.290	11954	BV	0.096	1.7080	
32	21.818	165408	BV	0.111	23.6339	C22:6 Ω-3
Totals:		699877			100.0000	

ภาพภาคผนวก ๓5 (ต่อ)



ภาพภาคผนวก ข6 ค่า Retention Time ขององค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่า

Peak No.	Ret. Time(min)	Area	Type	Height	Area(%)	Fatty Acid
1	4.271	113410.37	BB	54199.79	2.68	C14:0
2	5.238	29400.59	BB	12391.37	0.70	
3	6.503	723318.99	BV	166398.97	17.13	C16:0
4	6.814	206899.12	VV	66630.72	4.90	
5	7.131	21428.38	VB	3780.02	0.51	
6	7.590	30083.73	BV	10569.40	0.72	
7	7.732	38282.17	VB	13528.41	0.91	
8	8.070	34003.07	BB	11308.43	0.81	
9	9.199	188569.29	BV	40952.13	4.47	C18:0
10	9.570	772182.29	VV	141665.35	18.28	C18:1 ω-9
11	9.628	100788.90	VB	47799.01	2.39	
12	10.182	50837.75	BB	18487.48	1.20	
13	10.609	13822.63	BB	3505.72	0.32	
14	10.956	19650.69	VV	5817.77	0.47	
15	11.146	21658.27	VB	8382.77	0.52	
16	11.601	29352.51	BB	11651.58	0.70	
17	11.938	11606.34	BV	4732.24	0.27	
18	12.213	125177.23	VV	37844.64	2.96	
19	12.296	10484.38	VB	3139.05	0.25	
20	12.788	13978.82	BB	5176.30	0.33	
21	13.167	8926.19	BB	2492.69	0.21	
22	13.522	87096.13	BV	28611.39	2.07	C20:4 ω-6
23	13.688	10791.27	VB	3880.56	0.25	
24	14.143	21760.22	BB	7127.20	0.52	
25	14.586	274013.80	BV	66982.56	6.48	C20:5 ω-3
26	14.789	47372.70	VV	11989.59	1.12	
27	14.885	16351.89	VB	5521.86	0.38	
28	16.834	12890.91	BB	3020.22	0.30	
29	17.495	54439.02	BB	12615.13	1.29	
30	18.405	73269.51	BB	12928.62	1.73	
31	18.963	31887.29	BB	6432.47	0.76	
32	19.409	1029241.21	BB	99785.93	24.37	C22:6 ω-3
Totals:		4222975.65		939956.42	100.00	

ภาพภาคผนวก ข6 (ต่อ)

ภาคผนวก ค

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (Perrin and Dempsey, 1974)

โดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอช 7.0 โดยการวัดด้วยเครื่องวัดพีเอช

สารละลาย A : สารละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13.799 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 17.805 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

2. การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเอทานอล ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (A.O.A.C., 1990)

ชั่งสารโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์น้ำหนัก 28.055 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้ได้ 1 ลิตร สารละลายที่ได้ควรมีสีเหลืองฟางหรือไม่มีสี เก็บสารละลายที่ได้ในขวดแก้วสีชาที่สะอาดซึ่งฝาปิดไม่เป็นแก้ว โดยเตรียมสารละลายไว้อย่างน้อย 5 วันก่อนนำไปใช้

3. การเตรียมและหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (A.O.A.C., 1990)

การเตรียม

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 45 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน (ได้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล เจือจางด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า ได้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล) เก็บสารละลายที่ได้ในขวดแก้วสีชาที่สะอาด

การหาความเข้มข้น

ชั่งสารโซเดียมเตตราโบเรต (Borex: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) ให้ได้น้ำหนักแน่นอน 2.0 กรัม (สำหรับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ไตเตรทกับกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เตรียมได้ ใช้สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูที่จุดยุติ แล้วคำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)} = \frac{\text{น้ำหนักสารโซเดียมเตตราโบเรต(กรัม)}}{\text{ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท(มล.)} \times 0.1907}$$

สมมูลของเตตราโบเรต = 190.72

4. การเตรียมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (A.O.A.C., 1990)

ชั่งฟีนอล์ฟทาลีนน้ำหนัก 1 กรัม ละลายในเอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ง1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของกิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึงเอนไซม์ไลเปส PS และ D ตรึงรูป

	SV	DF	SS	MS	F
ไลเปส PS ตรึงรูป :	Treatment (T)	2	1.3200	0.6600	3300.00*
กิจกรรมเอนไซม์	Error	6	0.0012	0.0002	
ที่ถูกตรึง	Total	8	1.3212		
ไลเปส D ตรึงรูป :	Treatment (T)	2	3.9900	1.9950	4987.50*
กิจกรรมเอนไซม์	Error	6	0.0024	0.0004	
ที่ถูกตรึง	Total	8	3.9924		

^{ns} : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวก ง2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ใน ส่วนของ FFA-PS โดยให้เอนไซม์ไลเปส PS อิสระและตรึงรูป

	SV	DF	SS	MS	F
FFA-PS ที่ได้	Treatment (T)	1	22.9361	22.9361	206.08*
	Error	4	0.4453	0.1113	
	Total	5	23.3814		
ω -3 PUFAs ในส่วน ของ FFA-PS	Treatment (T)	1	15.4842	15.4842	814.96*
	Error	2	0.0381	0.0190	
	Total	3	15.5223		
% recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS	Treatment (T)	1	112.7844	112.7844	2349.68*
	Error	2	0.0961	0.0480	
	Total	3	112.8805		

^{ns} : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวก ง3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มความเข้มข้น
ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-PS

	SV	DF	SS	MS	F
ปริมาณเอโนไซม์ :	Treatment (T)	6	2397.7800	399.6300	586.83*
FFA-PS ที่ได้	Error	14	9.5340	0.6810	
	Total	20	2407.3140		
ปริมาณเอโนไซม์ :	Treatment (T)	6	1990.9680	331.8280	1213.34*
% recovery ของ ω -3	Error	7	1.7990	0.2570	
PUFAs ในส่วนของ	Total	13	1992.7670		
FFA-PS					
ปริมาณน้ำ :	Treatment (T)	4	1956.7179	489.1790	2042.63*
FFA-PS ที่ได้	Error	10	2.2950	0.2390	
	Total	14	1959.1119		
ปริมาณน้ำ :	Treatment (T)	4	872.6487	218.1620	905.24*
% recovery ของ ω -3	Error	5	1.2051	0.2410	
PUFAs ในส่วนของ	Total	9	873.8538		
FFA-PS					
อุณหภูมิ :	Treatment (T)	3	308.7388	102.9129	307.29*
FFA-PS ที่ได้	Error	8	2.6792	0.3349	
	Total	11	311.4180		
อุณหภูมิ :	Treatment (T)	3	179.7783	59.9260	288.80*
% recovery ของ ω -3	Error	4	0.8301	0.2080	
PUFAs ในส่วนของ	Total	7	180.6084		
FFA-PS					

ตารางภาคผนวก ง3 (ต่อ)

	SV	DF	SS	MS	F
ระยะเวลา :	Treatment (T)	5	14931.8400	2986.3680	35509.73*
FFA-PS ที่ได้	Error	12	1.0092	0.0841	
	Total	17	14932.8492		
ระยะเวลา :	Treatment (T)	5	11728.0300	2345.6060	378.63*
% recovery ของ ω -3	Error	6	37.1700	6.1950	
PUFAs ในส่วนของ FFA-PS	Total	11	11765.2000		

^{ns} : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวก ง4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ใน ส่วนของ FFA-D โดยใช้เอนไซม์ไลเปส D อีสระและตรึงรูป

	SV	DF	SS	MS	F
FFA-D ที่เหลือ	Treatment (T)	1	101.5500	101.5500	193.72*
	Error	4	2.0970	0.5242	
	Total	5	103.6470		
ω -3 PUFAs ในส่วน ของ FFA-D	Treatment (T)	1	9.3636	9.3636	39.91*
	Error	2	0.4693	0.2346	
	Total	3	9.8329		

^{ns} : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวก ง5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มความเข้มข้น
ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ FFA-D

	SV	DF	SS	MS	F
ปริมาณเอนไซม์:	Treatment (T)	5	132.4100	26.4820	1.14*
FFA-D ที่เหลือ	Error	12	278.0280	23.1690	
	Total	17	410.4380		
ปริมาณเอนไซม์:	Treatment (T)	5	117.8250	23.5650	231.03*
ω -3 PUFAs ในส่วน	Error	6	0.6120	0.1020	
ของ FFA-D	Total	11	118.4370		
ปริมาณน้ำ:	Treatment (T)	4	157.6040	39.4010	1.59
FFA-D ที่เหลือ	Error	10	240.0300	24.8030	
	Total	14	397.6340		
ปริมาณน้ำ:	Treatment (T)	4	157.7680	39.4420	303.40*
ω -3 PUFAs ในส่วน	Error	5	0.6500	0.1300	
ของ FFA-D	Total	9	158.4180		
อัตราส่วน FFA-PS ต่อ	Treatment (T)	4	3550.6920	887.6730	68.21*
ลยริลแอลกอฮอล์:	Error	10	130.1300	13.0130	
FFA-D ที่เหลือ	Total	14	3680.8220		
อัตราส่วน FFA-PS ต่อ	Treatment (T)	4	679.5800	169.8950	1231.12*
ลยริลแอลกอฮอล์:	Error	5	0.6900	0.1380	
ω -3 PUFAs ในส่วน	Total	9	680.2700		
ของ FFA-D					

ตารางภาคผนวก ง5 (ต่อ)

	SV	DF	SS	MS	F
อุณหภูมิ :	Treatment (T)	3	81.1380	27.0460	155.44*
FFA-D ที่เหลือ	Error	8	1.3920	0.1740	
	Total	11	82.5300		
อุณหภูมิ :	Treatment (T)	3	332.0430	110.6810	1106.81*
ω -3 PUFAs ในส่วน	Error	4	0.4000	0.1000	
ของ FFA-D	Total	7	332.4430		
ระยะเวลา :	Treatment (T)	6	5372.1240	895.3540	2.93*
FFA-D ที่เหลือ	Error	14	4276.1320	305.4380	
	Total	20	9648.2560		
ระยะเวลา :	Treatment (T)	6	1237.7340	206.2890	1242.70*
ω -3 PUFAs ในส่วน	Error	7	1.1620	0.1660	
ของ FFA-D	Total	13	1238.8960		

^{ns} : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวก ง6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ใน ส่วนของ MG-D โดยใช้เอนไซม์ไลเปส D อีสาระและตรีงรูป

	SV	DF	SS	MS	F
MG-D ที่ได้	Treatment (T)	1	7.0981	7.0981	89.06*
	Error	4	0.3188	0.0797	
	Total	5	7.4169		
ω -3 PUFAs ในส่วน ของ MG-D	Treatment (T)	1	0.6889	0.6889	45.03*
	Error	2	0.0306	0.0153	
	Total	3	0.7195		
% recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วน ของ MG-D	Treatment (T)	1	8.1225	8.1225	1846.02*
	Error	2	0.0089	0.0044	
	Total	3	8.1314		

^{ns} : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวก ง7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มความเข้มข้น
ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D

	SV	DF	SS	MS	F
ปริมาณเอโนไซม์ :	Treatment (T)	4	36.0800	9.0200	14.50*
MG-D ที่ได้	Error	10	6.2200	0.6220	
	Total	14	42.3000		
ปริมาณเอโนไซม์ :	Treatment (T)	4	876.7160	219.1790	4653.48*
% recovery ของ ω -3	Error	5	0.2355	0.0471	
PUFAs ในส่วนของ	Total	9	876.9515		
MG-D					
ปริมาณน้ำ :	Treatment (T)	4	18.8880	4.7220	7.16*
MG-D ที่ได้	Error	10	6.5900	0.6590	
	Total	14	25.4780		
ปริมาณน้ำ :	Treatment (T)	4	73.8320	18.4580	373.64*
% recovery ของ ω -3	Error	5	0.2470	0.0494	
PUFAs ในส่วนของ	Total	9	74.0790		
MG-D					
อุณหภูมิ :	Treatment (T)	3	88.5780	29.5260	2.50*
MG-D ที่ได้	Error	8	94.3600	11.7950	
	Total	11	182.9380		
อุณหภูมิ :	Treatment (T)	3	343.6650	114.5550	13637.50*
% recovery ของ ω -3	Error	4	0.0336	0.0084	
PUFAs ในส่วนของ	Total	7	343.6986		
MG-D					

ตารางภาคผนวก ง7 (ต่อ)

	SV	DF	SS	MS	F
ระยะเวลา :	Treatment (T)	6	881.8680	146.9780	293.96*
MG-D ที่ได้	Error	14	7.0000	0.5000	
	Total	20	888.8680		
ระยะเวลา :	Treatment (T)	6	1669.8360	278.3060	12766.33*
% recovery ของ ω -3	Error	7	0.1526	0.0218	
PUFAs ในส่วนของ MG-D	Total	13	1669.9886		

^{ns} : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวก ง8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ให้
อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์โดยการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันระหว่าง FFA-D
กับ MG-D ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรังรูป Lipozyme® IM

	SV	DF	SS	MS	F
TG ที่ได้	Treatment (T)	3	8282.5500	2760.8500	3905.02*
	Error	8	5.6560	0.7070	
	Total	11	8288.2060		
ω -3 PUFAs ในส่วน ของ TG	Treatment (T)	3	8164.6560	2721.5520	358098.95*
	Error	4	0.0304	0.0076	
	Total	7	8164.6864		
% recovery ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ TG	Treatment (T)	3	3177.3060	1059.1020	407346.92*
	Error	4	0.0104	0.0026	
	Total	7	3177.3164		

^{ns} : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวก ง9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการนำเอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูปมาใช้ซ้ำใน การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-PS

	SV	DF	SS	MS	F
ไลเปส PS ตรึงรูป :	Treatment (T)	4	13533.3920	3383.3480	32848.04*
FFA-PS ที่ได้	Error	10	1.0300	0.1030	
	Total	14	13534.4220		
ไลเปส PS ตรึงรูป :	Treatment (T)	4	1859.3480	464.8370	4427.02*
ω -3 PUFAs ในส่วน	Error	5	0.5250	0.1050	
ของ FFA-PS	Total	14	1859.8730		
ไลเปส PS ตรึงรูป :	Treatment (T)	4	20331559.2	5082889.80	1.01*
% recover ของ ω -3	Error	5	25197547.5	5039509.50	
PUFAs ในส่วนของ	Total	9	45529106.7		
FFA-PS					
กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส	Treatment (T)	4	1.4960	0.3740	1870.00*
PS ตรึงรูปที่เหลือ	Error	10	0.0020	0.0002	
	Total	14	1.4980		

^{ns} : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวก ง10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการนำเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปมาใช้ซ้ำใน การเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของกรดไขมันอิสระ FFA-D

	SV	DF	SS	MS	F
ไลเปส D ตรึงรูป :	Treatment (T)	6	975.3480	162.5580	388.89*
FFA-D ที่เหลือ	Error	14	5.8520	0.4180	
	Total	20	981.2000		
ไลเปส D ตรึงรูป :	Treatment (T)	6	8254.4280	1375.7380	54162.91*
ω -3 PUFAs ในส่วน	Error	8	0.2032	0.0254	
ของ FFA-D	Total	14	8254.6312		
กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส D	Treatment (T)	6	1.5780	0.2630	93.93*
ตรึงรูปที่เหลือ	Error	14	0.0392	0.0028	
	Total	20	1.6172		

^{ns} : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวก ง11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการนำเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปมาใช้ซ้ำในการเพิ่มความเข้มข้นของ ω -3 PUFAs ในส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ MG-D

	SV	DF	SS	MS	F
ไลเปส D ตรึงรูป : MG-D ที่ได้	Treatment (T)	6	910.8960	151.8160	1297.57*
	Error	14	1.6380	0.1170	
	Total	20	912.5340		
ไลเปส D ตรึงรูป : ω -3 PUFAs ในส่วน ของ MG-D	Treatment (T)	6	7121.3400	1186.8900	75119.62*
	Error	8	0.1264	0.0158	
	Total	14	7121.4664		
ไลเปส D ตรึงรูป : % recover ของ ω -3 PUFAs ในส่วนของ MG-D	Treatment (T)	6	2248.3980	374.7330	74946.60*
	Error	8	0.0400	0.0050	
	Total	14	2248.4380		
กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส D ตรึงรูปที่เหลือ	Treatment (T)	6	1.4760	0.2460	164.00*
	Error	14	0.0210	0.0015	
	Total	20	1.4970		

^{ns} : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวอัญชลี สาระโปก

วัน เดือน ปีเกิด 1 พฤศจิกายน 2518

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2540

ทุนการศึกษา

ทุนการศึกษาจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ผลงาน

Enrichment of the ω -3 polyunsaturated fatty acids in tuna oil by immobilized lipases

Anchalee Sarabok¹, Suttawut Benjakul² and Aran H-Kittikun³

¹M. Sc. student, ²Assoc. Prof. and ³Assoc. Prof.

Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University,

Hat Yai 90112, THAILAND (e-mail: g4182025@maliwan.psu.ac.th)

Tuna oil is rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFAs), especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) which have various physiological functions and medical applications. These benefits drew attention to enrich the ω -3 PUFAs in tuna oil. Because ω -3 PUFAs are sensitive to elevated temperature, extreme pH etc., lipase required mild reaction was the desire method for enrichment of ω -3 PUFAs in tuna oil. The original tuna oil contained 6.42%EPA and 27.18%DHA. This work tried to enrich the ω -3 PUFAs in tuna oil by immobilized lipases. Three commercial lipases, Lipase-PS (*Pseudomonas sp.* lipase), Lipase-D (*Rhizopus delemar* lipase) and Lipase-OF (*Candida rugosa* lipase) selected from the literature reviews were immobilized by physical adsorption on Accurel, EP-100 (particle size less than 200 μ m). The immobilized lipases had activity 0.94, 1.45 and 1.31 U/mg support, respectively. Immobilized Lipase-PS was used to enrich the ω -3 PUFAs of tuna oil in the free fatty acid (FFA) fraction by selective hydrolysis. The optimal conditions for hydrolysis of tuna oil with immobilized Lipase-PS were determined. The mixture of tuna oil and water (1.5:1) and 30 U of immobilized Lipase-PS /g of reaction mixture were mixed at 45°C for 24 h. After hydrolysis, the FFA fraction was 79.95%. The ω -3 PUFAs in this fraction was 36.58% (6.50%EPA and 30.08%DHA) accounted to 87.04% ω -3 PUFAs recovery of the original tuna oil. Selective esterification was then conducted at 30°C for 20 h by stirring a mixture of 4 g FFA-PS and octanol (1:2 mol/mol), 1 g water and 50 U of immobilized Lipase-D/g of reaction mixture. As the result, the ω -3 PUFAs content in the unesterified free fatty acid (FFA-D) fraction could be raised from 36.58 to 48.14% with

24.48% ω -3 PUFAs recovery. Furthermore, enrichment of ω -3 PUFAs in glycerides by selective hydrolysis of tuna oil with immobilized Lipase-OF was determined. When a mixture of tuna oil and water (1:1 w/w) was stirred with 50 U of immobilized Lipase-OF/g of reaction mixture at 30°C for 24 h, the glycerides (Glycerides-OF) were generated 33.55% with 47.25% of ω -3 PUFAs (3.81%EPA and 43.44%DHA). The ω -3 PUFAs recovery in the Glycerides-OF fraction was 47.18%. The esterification of Glycerides-OF with FFA-D to produce triglycerides rich in ω -3 PUFAs by immobilized *Rhizomucor miehei* lipase is under investigation.

การนำเสนอผลงานวิจัยภาคโปรตีนในงานสัมมนา The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology เรื่อง Biotechnology:Impacts and Trends ระหว่างวันที่ 1-3 พฤศจิกายน 2543 ณ โรงแรมเฟลิกซ์ จังหวัด กาญจนบุรี