บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การประยุกต์ใช้ไลเปสจาก *Bacillus stearothermophilus* P1 ในการเตรียมกรดไขมันโอเมกา-3EPA และ DHA จากน้ำมันปลา

ผู้เขียนรายงาน รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล

ในน้ำมันปลามีกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากโดยเฉพาะกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิค(EPA) และโดโคซะเฮกซะอีโนอิค(DHA) ซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็นที่มีบทบาทสำคัญการพัฒนาสมองและตา ส่วนใหญ่กรดไขมันเหล่านี้พบมากในปลาทะเลและพบน้อยในปลาน้ำจืด ปริมาณของ EPA และ DHA ในน้ำมันปลาจาก red snapper (*Lutjanus argentimaculatus* Forskal), Danglee, menhaden (*Brevoortia* sp.) น้ำมันปลาทูน่าสกัดโยการบีบอัดหัวปลาและน้ำมันจากเบ้าตา และ Walking catfish (*Clarias* sp.) ตรวจวัดโดยโครมาโทกราฟีก๊าซ ปริมาณของ DHA สูงสุดพบในน้ำมันจากเบ้าตาปลาทูน่า (54.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาจากน้ำมันปลาทูน่าที่ได้จากการบีบอัด (53.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)ในขณะที่ปริมาณของ EPA พบสูงสุดในน้ำมันปลาเมนฮาเดน (25.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาพบในน้ำมันปลาทูน่าที่ได้จากการบีบอัด (14.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณสูงสุดของกรดโอเลอิคพบใน Walking catfish oil (100.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคือ น้ำมันปลา Danglee (63.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้คัดเลือกน้ำมันจากปลาทูน่าที่ได้จากการบีบอัดเพื่อศึกษาการเตรียม DHA และ EPA เข้มข้นโดยปฏิกิริยาทางเอนไซม์

การศึกษาไลเปสทนความร้อนจาก clone pQE-TP811 และ pQE-p1 ซึ่งได้ยีนจาก *Bacillus stearothermophilus* สายพันธุ์ TP811 และ P1 หาแอคติวิตีโดยใช้ p-nitrophenyl laurate เป็นสับสเตรทและใช้น้ำมันมะกอกและน้ำมันปลาทูน่าจากบริษัท ที.ซี. ยูเนี่ยน ฟูดส์ จำกัด ในการศึกษาจลนศาสตร์ ค่า Michaelis constant (Km) ของไลเปสที่ได้จาก pQE-TP811 โดยใช้ p-nitrophenyl laurate น้ำมันมะกอกและน้ำมันปลาทูน่าเป็นสับสเตรทมีค่า 7.29 7.63 และ 17.90 มิลลิโมลาร์ ส่วนค่าความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (Vmax) มีค่า 2.53×10^{3} 1.39 และ 1.11 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า Km ของไลเปสที่ได้จาก pQE-P1 โดยใช้น้ำมันมะกอกและน้ำมันปลาทูน่าเป็นสับสเตรทมีค่า 16.34 และ 42.55 มิลลิโมลาร์ และ Vmax มีค่า 4.52 และ 4.50 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ไลเปสเข้มข้นจาก pQE-TP811 และ P1 มีแอคติวิตี 2839 และ 2739 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาตรึงบนซีไลท์ 4.2 และ 3.5 กรัมได้ไลเปสตรึงมีแอคติวิตี 3652 และ 3253 ยูนิตต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งแอคติวิตีลดลงหลังการตรึง 10 % และ 16 % ตามลำดับ การวัดค่าปริมาณความจุน้ำ (water content, C_w) และแอคติวิตีน้ำ (water activity, A_w) ของไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 มีค่า 0.52% และ 0.44 ส่วนไลเปสตรึงจาก pQE-P1 มีค่า 0.69% และ 0.46 ตามลำดับ ค่า Km ของไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 เมื่อใช้น้ำมันมะกอกและน้ำมันปลาทูน่าเป็นสับสเตรทมีค่า 4.38 และ 15.75

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มิลลิโมลาร์ และ Vmax มีค่า 76.34 และ 81.30 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนค่าของ Km ของไลเปสตรึงที่ได้จาก pQE-P1 มีค่า 5.46 และ 7.14 มิลลิโมลาร์ และ Vmax มีค่า 51.28 และ 7.02 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ได้ใช้ไลเปสตรึงเร่งปฏิกิริยา ethanolysis ของน้ำมันปลาทูน่าที่ 37°ซ เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยโครมาโทกราฟีก๊าซ ไลเปสจากโคลน pQE-TP811 และ โคลน pQE-P1 เป็นยีนไลเปสทนความร้อนจากแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* TP811 และ P1 และไลเปสทางการค้าจาก *Candida antarctica* (ไลเปส A) *Pseudomonas fluorescens* PS และ *Mucor mehei* ถูกตรึงบน celite 545 ค่า A_w และ C_w ของเอนไซม์ตรึงอยู่ในช่วง 0.44-0.61 และ 0.5-0.87% ตามลำดับ ปริมาณ DHA สูงสุดได้จากปฏิกิริยาเอทาโนไลซีสที่เร่งด้วย *P. fluorescens* PS ไลเปสตรึง (0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคือ ปฏิกิริยาที่เร่งด้วยไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 (0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ *Mucor mehei* (0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ เอนไซม์ ไลเปสตรึงจาก pQE-P1 เร่งปฏิกิริยาเอทาโนไลซีสของน้ำมันปลาได้ต่ำสุดให้ปริมาณ DHA เพียง 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อน้ำมันปลาทูน่ามาไฮโดรไลส์ด้วยวิธีทางเคมีได้อัตราส่วนปริมาณ ethyl oleate : ethyl linoleate : ethyl docosahexaenoate โดยอาศัยเปอร์เซนต์พื้นที่ใต้ peak ของโครมาโทแกรมในโครมาโทกราฟีก๊าซ เป็น 1 : 1 : 0.5 เอทาโนไลซีสที่เร่งโดยไลเปสตรึงจะมีอัตราส่วนเป็น 1 : 0-1.4 : 18.2-104 ไลเปส A ซึ่งมีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 2 ในการไฮโดรไลส์ ไตรกลีเซอไรด์มีอัตราส่วนของกรดไขมันเป็น 1 : 0 : 104 อัตราส่วนของกรดไขมันที่ได้จาก เอทาโนไลซีสที่เร่งโดยไลเปสจาก *P. fluorescens* PS, *Mucor mehei* , pQE-TP811และ pQE-P1 เป็น 1 : 0.9 : 42.7,1 : 1 : 32.3 และ 1 : 1.2 : 18.2 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไลเปสตรึงทุกชนิดมีความจำเพาะต่อกรดโดโคซะเพนตะอีโนอิคมากกว่ากรดโอเลอิคและลิโนเลอิคไลเปสจาก *P. fluorescens* PS และ pQE-TP811 มีแอคติวิตีสูงสุดจึงเลือกมาใช้ในการเตรียม DHA เข้มข้นโดยเร่งปฏิกิริยาเอทาโนไลซีสของน้ำมันปลาทูน่าที่ได้จากการบีบอัด การทดสอบอายุการใช้งานของเอนไซม์ไลเปสตรึงทั้งสองชนิดพบว่า แอคติวิตีสูงสุดในการใช้งานครั้งแรกจะค่อยๆลดลงจนถึงรอบที่ 5 เมื่อทดลองเติมน้ำลงไปในระบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Abstract

Title Application of *Bacillus stearothermophilus* P1 Lipase for the Preparation of Omega-3 Fatty Acid EPA and DHA from Fish Oil

Report by Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul

Fish oil contains polyunsaturated fatty acid especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) which are essential fatty acid that play an important role for brain and eye development. Most of these fatty acids are found in marine fish and a few found in freshwater fish. The content of EPA and DHA in fish oil from red snapper (*Lutjanus argentimaculatus* Forskal), Danglee, menhaden(*Brevoortia* sp.), tuna oil from condentsate and cooked tuna head pressing , eye socket oil of tuna and walking catfish (*Clarias* sp.) were determined by gas chromatography. The highest content of DHA found in eye socket oil of tuna was about 59.45 mg/ml followed by the content in tuna oil from cooked tuna head pressing was 53.60 mg/ml whereas the high content of EPA found in the menhaden oil was 25.49 mg/ml followed by the content in cooked tuna head pressing was 14.40 mg/ml. The high content of oleic acid was found in walking catfish oil 100.28 mg/ml followed by Danglee oil was 63.56 mg/ml. The tuna oil from cooked tuna head pressing was selected as substrate for enrichment of DHA and EPA by lipase catalyzed ethanolysis.

The thermostable lipase from cloned pQE-TP811 and cloned pQE-P1 carrying thermostable lipase gene from *Bacillus stearothermophilus* strain TP811m and P1 were studied. The hydrolysis activity of lipases were assayed using p-nitrophenyl laurate as substrate. The kinetic of lipase using olive oil and tuna oil from T.C. union food Ltd. as substrate were studied. The Michaelis-Menten constant(Km) of lipase from pQE-TP811 using p-nitrophenyl laurate, olive oil and tuna oil as substrate were 7.29, 7.63 and 17.90 mM and the maximal velocity(Vmax) were 2.53×10^3, 1.29 and 1.11 $\mu mol.min^{-1}.ml^{-1}$, respectively. The Km values of the lipase from pQE-P1 using olive oil and tuna oil as substrate were 16.34 and 42.55 mM and the Vmax were 4.52 and 4.50 $\mu mol.min^{-1}.ml^{-1}$, respectively. The activity of the concentrated lipases from pQE-TP811 and pQE-P1 were 2839 and 2739 U/ml. Both lipases were immobilized on 4.2 and 3.5 g of celite 545 with 6 ml and 5 ml lipase solutions respectively. The activity of both immobilized lipases were 3652 and 3253 U/g, respectively. The activity decreased after immobilized about 10% and 16%, respectively. The water

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

content (C_w) and water activity (A_w) of the immobilized lipase from pQE-TP811 were 0.52% and 0.44, respectively. The C_w and A_w of the immobilized lipase from pQE-P1 were 0.69% and 0.46, respectively. The Km values of the immobilized lipase from pQE-TP811 on hydrolysis of olive oil and tuna oil were 4.38 and15.75 mM and the Vmax values were 76.34 and 81.30 $\mu mol.min^{-1}.ml^{-1}$, respectively. The Km values of the immobilized lipase from pQE-P1 on hydrolysis of olive oil and tuna oil were 5.46 and 7.14 mM and the Vmax values were 51.28 and 7.02 $\mu mol.min^{-1}.ml^{-1}$, respectively.

The use of immobilized lipases for ethanolysis of tuna oil was investigated. The ethanolysis was performed at 37°C with shaking 200 rpm for 24 h. The reaction products were analyzed by gas chromatography. The lipases from cloned pQE-TP811 and cloned pQE-P1 carrying thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* strain TP811 and P1 and commercial lipase from recombinant *Candida antarctica* (lipase A), *Pseudomonas fluorescens* PS, and *Mucor mehei* were immobilized on celite 545. The water activity and water content of the immobilized lipases were 0.44-0.61 and 0.52-0.87% respectively. The highest yield of ethyl docosahexaenoate from the alcoholysis was obtained using immobilized *P. fluorescens* PS lipase (0.39 mg/ml) whereas the reaction using immobilized lipase from pQE-TP811 and *Mucor mehei* gave the fatty acid ethyl ester 0.30 and 0.28 mg/ml respectively. The immobilized lipase from pQE-P1 had low catalytic activity and gave 0.12 mg/ml of ethyl docosahexaenoate. The complete hydrolysis of tuna oil by chemical reaction yielded and the ethyl oleate : ethyl linoleate : ethyl docosahexaenoate ratio based on gas chromatogram peak area percentages about 1 : 1 : 0.5. The ethanolysis catalyzed by immobilized lipases gave ratio in the range 1 : 0-1.4 : 18.2-104 . The lipase A which had high 2-positional specificity in hydrolysis of triacylglycerol gave ratio of the fatty acid ethyl esters 1 : 0 : 104. The ratio of ethanolysis products catalyzed by lipase from *P. fluorescens* PS, *Mucor mehei* , pQE-TP811 and pQE-P1 were 1 : 0.9 : 42.7, 1 : 1 : 32.3 and 1 : 1.2 : 18.2 respectively. The results indicated that all of immobilized lipases had high specificity to docosahexaenoic acid than oleic acid and linoleic acid. The lipases from *P. fluorescens* PS and pQE-TP811 were used for enrichment of docosahexaenoate by ethanolysis of cooked tuna head pressing. The operational stability of the immonbilized pQE-TP811 lipase and PS lipase were also studied and found that the activity of immobilized enzyme were hight at the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

first cycle of operation and gradually decrease until the fifth cycle. Addition of water into the system did not improve the yield.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved