

## บทที่ 4

### วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

#### 4.1 การตรวจสอบปริมาณ EPA และ DHA ในน้ำมันปลาชนิดต่างๆ เพื่อการคัดเลือก

กรดไขมันชนิดโอเมก้า-3 โดยเฉพาะ EPA (eicosapentaenoic acid) และ DHA (docosahexaenoic acid) เป็นกรดไขมันจำเป็นที่พบมากในน้ำมันปลาโดยเฉพาะน้ำมันจากปลาทะเล และเป็นกรดไขมันที่มีความสำคัญต่อสุขภาพและการพัฒนาการของทารก<sup>(64,65)</sup> ในการวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ DHA และ EPA จากน้ำมันชนิดต่างๆ 7 ชนิด ดังนี้ น้ำมันปลากะพง ปลาแดงลี ปลาเมนฮาดเดน ปลาดุกน้ำจืด และน้ำมันปลาทูน่าที่ได้มาจาก 3 ส่วน คือ จากส่วนหัวปลาทูน่าหนึ่งที่ยกโดยการบีบอัด จากเบ้าตาปลาทูน่า และจากน้ำนิ่งปลา โดยการไฮโดรไลส์ด้วยวิธีทางเคมีแล้วตรวจวิเคราะห์หาปริมาณด้วยโครมาโทกราฟีแก๊ส พบว่าน้ำมันเบ้าตาปลาทูน่ามี DHA สูงสุดคือ 59.75 มก./มล. รองลงมาเป็นน้ำมันปลาทูน่าที่ได้จากการบีบอัด 53.60 มก./มล. ส่วนน้ำมันที่มี EPA สูงสุดคือ น้ำมันจากปลาเมนฮาดเดน 25.49 มก./มล. รองลงมาเป็นน้ำมันจากการบีบอัด 7.43 มก./มล. ในการเลือกแหล่งน้ำมันปลาที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียม DHA และ EPA เข้มข้น ต้องพิจารณาแหล่งที่มีปริมาณกรดไขมันทั้งสองสูง และมีแหล่งที่สกัดออกมาได้ปริมาณมาก จากการวิเคราะห์ถึงแม้ว่าน้ำมันจากเบ้าตาปลาทูน่าจะมีปริมาณ DHA สูง แต่แหล่งที่สกัดได้มีปริมาณน้อยและมีปริมาณ EPA ต่ำกว่าน้ำมันปลาทูน่าที่ได้จากการบีบอัด งานวิจัยนี้เลือกน้ำมันปลาทูน่าที่ได้จากการบีบอัดเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมในการเตรียม DHA และ EPA เข้มข้น โดยใช้ปฏิกิริยาเอทานอลิซิสด้วยเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากมีปริมาณ DHA รองจากน้ำมันปลาทูน่าไม่มากนักและมีปริมาณ EPA รองจากน้ำมันปลาเมนฮาดเดนและที่สำคัญแหล่งของน้ำมันปลาที่ได้จากการบีบอัดมีปริมาณมาก

#### 4.2 การศึกษาเอนไซม์ไลเปสที่จะใช้เร่งปฏิกิริยาเอทานอลิซิสน้ำมันปลาทูน่า

เอนไซม์ที่จะใช้ในการทดลองเป็นเอนไซม์ไลเปสทนความร้อนได้จากแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ *Bacillus stearothermophilus* TP811 และ P1 ที่ได้ทำการโคลนนิ่งแล้วเป็นโคลน pQE-TP811 และ pQE-P1 ซึ่งทั้งสองตัวนี้มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกันมากกว่า 93%<sup>(8,26,66)</sup> ก่อนนำมาทดลองได้ศึกษาสมบัติบางประการเช่น การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์เพื่อดูแนวโน้มความเป็นไปได้ในการนำไปใช้งาน นอกจากนี้ยังมีการนำไลเปสทางการค้าเพื่อเป็นตัวศึกษาเปรียบเทียบกับได้แก่ lipase A จาก recombinant *Candida antarctica* ซึ่งมีความสามารถในการตัดจำเพาะที่ตำแหน่งที่ 2 บนไตรกลีเซอไรด์<sup>(16,67)</sup> lipase PS จาก *P. fluorescens* จากบริษัท Amano มีความสามารถในการตัดไม่จำเพาะ<sup>(68)</sup> และไลเปสจาก *Mucor miehei* มีความสามารถ

ในการตัดจำเพาะตำแหน่ง 1,3 บนไตรกลีเซอไรด์<sup>(69)</sup> จากการวิเคราะห์แอกติวิตีของไลเปสจาก pQE-TP811 และ pQE-P1 เบื้องต้นพบว่าไลเปสจาก pQE-TP811 มี Specific activity สูงกว่า pQE-P1 เล็กน้อย เมื่อใช้สับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenyl laurate เป็นสับสเตรท ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของไลเปสตรังจาก pQE-TP811 และ pQE-P1 ค่า Km ที่ได้จากไลเปส pQE-TP811 สามารถบ่งบอกถึงปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสน้ำมันปลาและน้ำมันมะกอกได้ดีกว่าไลเปสจาก pQE-P1 ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาสมบัติและความจำเพาะต่อสับสเตรทของไลเปส *B. stearothermophilus* P1 ที่ได้ทำการโคลนแล้วว่าไลเปสนี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่มีกรดไขมันที่มีคาร์บอนจำนวน 10 ตัว มากที่สุด<sup>(7)</sup> และประสิทธิภาพในการตัดกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนสูงๆ ต่ำซึ่งสอดคล้องกับค่า Km ที่คำนวณได้ เนื่องจากไลเปสที่ใช้ในการทดลองไม่ใช่ไลเปสบริสุทธิ์ดังนั้นค่า Km และ Vmax ที่ได้จึงไม่ใช่ค่าที่แท้จริงของไลเปสทั้งสองตัวแต่สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาขั้นต่อไป

#### 4.3 การตรึงเอนไซม์ไลเปสและสมบัติของไลเปส

การศึกษาการใช้ไลเปสเร่งปฏิกิริยาเอทานอลไลซิสน้ำมันปลาในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยไลเปสตรังทั้ง 5 ชนิด ที่ตรึงบน celite 545 ได้ตรวจสอบแอกติวิตีทั้งก่อนและหลังการตรึง โดยใช้ p-nitrophenyl laurate เป็นสับสเตรท พบว่าหลังตรึงไลเปสเกือบทุกตัวมีแอกติวิตีลดลงเมื่อเทียบกับไลเปสอิสระยกเว้น ไลเปสตรังจาก *P. fluorescens* PS ที่มีแอกติวิตีเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปเมื่อตรึงแล้วเอนไซม์จะมีแอกติวิตีลดลงอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงบริเวณเร่งของเอนไซม์ที่ถูกดูดติดกับพาหะหรือการเข้าสัมผัสทำปฏิกิริยาของสับสเตรทกับเอนไซม์ลดลง ส่วนการที่ตรึงแล้วทำให้แอกติวิตีเพิ่มขึ้นอาจเป็นไปได้ว่าการตรึงทำให้บริเวณเร่งของไลเปสเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้เหมาะสมกับการทำปฏิกิริยาสับสเตรทมากขึ้น การตรึงเอนไซม์ไลเปสปริมาณน้ำมีความสำคัญต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาในสารละลายอินทรีย์<sup>(58,70)</sup> หากในปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสมีน้ำน้อยเกินไปอาจทำให้ประสิทธิภาพในการเร่งต่ำ ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณความจุน้ำ (water content, Cw) และแอกติวิตีน้ำ (water activity, Aw) ของไลเปสตรังทั้ง 5 ชนิด การศึกษาจลนศาสตร์ของไลเปสทนความร้อนตรึงจาก pQE-TP811 และ pQE-P1 โดยใช้ น้ำมันมะกอกและน้ำมันปลาทูน่าที่ผ่านการคัดเลือกเป็นสับสเตรทในการหาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาโดยใช้สับสเตรทที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ผลการตรวจสอบไลเปสตรังทั้งสองให้กราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกับความเร็วต้นเป็นกราฟไฮเปอร์โบลิตาตามสมการของ Michealis-Menten และได้กราฟเส้นตรงตามสมการของ Lineweaver-Burk ดังนั้นสามารถ

คำนวณค่า Km และ Vmax ของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยไลเปสทั้งสอง ค่า Km ของ pQE-TP811 เมื่อใช้น้ำมันมะกอกและน้ำมันปลาทუნ่าเป็นสับสเตรทมีค่า 4.38 และ 3.45 mM ส่วนค่า Vmax มีค่า 76.34 และ 26.88 U/ml ตามลำดับ ส่วนค่า Km ของ pQE-P1 เท่ากับ 34.60 และ 42.55 U/ml ส่วน Vmax มีค่า 1.42 และ 4.50 U/ml ตามลำดับ จากค่า Km พบว่าไลเปสตรังทั้งสองมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเอทานอลไลซิสดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับไลเปสอิสระ โดยเฉพาะไลเปสตรังจาก pQE-TP811 เมื่อพิจารณาค่า Km พบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาเอทานอลไลซิน้ำมันปลาทუნ่าได้ดีกว่าน้ำมันมะกอก ในขณะที่ในรูปไลเปสอิสระสามารถไฮโดรไลสน้ำมันมะกอกได้ดีกว่าส่วนไลเปสตรังจาก pQE-P1 มีความสามารถในการย่อยน้ำมันมะกอกและน้ำมันปลาทუნ่าไม่แตกต่างกันเนื่องจากไลเปสชนิดนี้ชอบกรดไขมันสายสั้นและมีความอิมิตัวมากกว่า ปริมาณน้ำและแอกติวิตีน้ำของไลเปสตรังทั้งสองไม่แตกต่างกัน ดังนั้นประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซิสของไลเปสทั้งสองจึงขึ้นอยู่กับความจำเพาะของไลเปสแต่ละชนิดเอง จากข้อมูลข้างต้นไลเปสตรังจาก pQE-TP811 มีแนวโน้มที่ชอบกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวในขณะที่ไลเปสตรังจาก pQE-P1 ชอบกรดไขมันสายสั้นและมีความอิมิตัว ซึ่งความแตกต่างกันของไลเปสทั้งสองตัวนี้ยังไม่สามารถอธิบายทั้งที่ลำดับอะมิโนของไลเปสทั้งสองนี้เหมือนกันมากกว่า 93%<sup>(8,26,66)</sup>

#### 4.4 การใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาเอทานอลไลซิสของน้ำมันปลาทუნ่าและน้ำมันปลา บริสุทธิ์ที่ทราบประมาณ DHA และ EPA

เนื่องจากการศึกษาปฏิกิริยาเอทานอลไลซินั้นไม่สามารถหา ethyl EPA มาตรฐานได้จึงใช้ methyl EPA มาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบซึ่งในปฏิกิริยาเอทานอลไลซิสของน้ำมันปลาทუნ่าที่ยังไม่บริสุทธิ์ทำให้มีพีคของสารอื่นที่บริเวณรีเทนชันไทม์ที่ใกล้เคียงกับเอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน EPA ที่ใกล้เคียงกับเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน EPA มาตรฐาน ทำให้ยากแก่การแปรผล ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกน้ำมันปลาบริสุทธิ์ที่มีขายและบอกปริมาณของ DHA และ EPA จำนวน 2 ยี่ห้อ คือ Omax-3 ซึ่งมีปริมาณ EPA ต่ำกว่า ยี่ห้อ Fish oil 1000 mg Win<sup>TM</sup> มากกว่า 3.5 เท่า มาทำปฏิกิริยาเอทานอลไลซิสด้วยเอนไซม์ไลเปสตรังจาก pQE-TP811 และตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันด้วยโครมาโทกราฟีก๊าซพบพีคที่ชัดเจนใกล้เคียงกับรีเทนชันไทม์ของ methyl EPA มาตรฐาน โดยพีคที่ได้จากเอทานอลไลซิสของ Omax-3 จะต่ำกว่าของ Fish oil 1000 mg Win<sup>TM</sup> ประมาณ 2 เท่า จึงสรุปได้ว่าตำแหน่งของพีคดังกล่าวเป็นพีคของ ethyl EPA ซึ่งสามารถเทียบหาปริมาณได้ ดังนั้นการหาปริมาณ ethyl EPA จึงใช้น้ำมันปลาบริสุทธิ์ยี่ห้อ Fish oil 1000 mg Win<sup>TM</sup> เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ โดยไฮโดรไลสน้ำมัน

มันปลาให้ สมบูรณ์และเตรียมเอทิลเอสเทอร์ด้วยวิธีทางเคมีเพื่อให้ได้ปริมาณ EPA ใกล้เคียงกับที่แจ้งปริมาณไว้ที่ฉลาก

ผลการทดลองทำเอทานอลไลซิสของน้ำมันปลาที่ได้ออกมาจากการบีบอัดหัวปลาที่ผ่านการแช่เย็นด้วยไลเปสตรึงทั้ง 5 ชนิด แล้ววิเคราะห์ปริมาณ ethyl EPA, ethyl DHA, ethyl linoleate และ ethyl oleate พบว่าไลเปสตรึงจาก *P.fluorescens* PS ให้ปริมาณเอทิล DHA สูงสุด(0.388 มก./มล.) รองลงมาเป็นไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 (0.300 มก./มล.) ส่วน lipase A ตรึง และไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 ให้ปริมาณ EPA ใกล้เคียงกันคือ 0.805 และ 0.100 มก./มล. ตามลำดับ รองลงมาได้จาก *P.fluorescens* PS (0.043 มก./มล.) ส่วนไลเปสตรึงจาก pQE-P1 มีแอกติวิตีต่ำสุดซึ่งเป็นไปตามความจำเพาะและค่า Km ที่ได้ทดลองไว้แล้ว นอกจากนี้เพื่อให้การอธิบายผลชัดเจนขึ้นได้ลองทำไฮโดรไลสน้ำมันปลาอย่างสมบูรณ์ด้วยวิธีทางเคมีแล้วหาปริมาณสัดส่วนของ ethyl oleate : ethyl linoleate : ethyl EPA : ethyl DHA ได้เป็น 1: 1: 0.1 : 0.5 เมื่อเทียบสัดส่วนของกรดไขมันดังกล่าวที่ได้จากการทำเอทานอลไลซิสน้ำมันปลาด้วยไลเปสตรึงทั้ง 5 ชนิด พบว่า lipase A ซึ่งมีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 2 จึงทำให้ได้ปริมาณ ethyl EPA และ ethyl DHA ในสัดส่วนที่สูงมาก เป็น 1 : 0 :35 :104.7 ส่วนอัตราส่วนปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการไฮโดรไลสของ *Mucor miehei* มีสัดส่วนรองลงมาเป็น 1: 1.4 :6.9 :49.7 ส่วนไลเปสตรึงจาก pQE-P1 มีความจำเพาะต่อกรดไขมันทั้งสองน้อยดังนั้นสัดส่วนที่ได้จึงต่ำสุด สำหรับไลเปสตรึงจาก *P.fluorescens* PS และ pQE-TP811 มีสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน แต่ไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 มีสัดส่วนของ ethyl EPA สูงกว่าประมาณ 2.3 เท่า ดังนั้นไลเปสตรึงนี้มีแนวโน้มที่จะชอบกรดไขมันสายยาวชนิดไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง หรืออาจมีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 2 บนไตรกลีเซอไรด์เนื่องจากกรดไขมันทั้งสองชนิดนี้มักอยู่ที่ตำแหน่งที่ 2 บนไตรกลีเซอไรด์<sup>(71)</sup> ดังนั้นงานวิจัยนี้เลือกไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 มาทำการศึกษาต่อไปโดยเปรียบเทียบกับไลเปสตรึงจาก *P.fluorescens* PS ซึ่งเป็นไลเปสทางการค้า เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ Cw ของไลเปสตรึงทั้งสองตัวนี้พบว่าไลเปสตรึงจาก *P.fluorescens* PS มีปริมาณน้ำสูงกว่า อาจมีผลทำให้เร่งปฏิกิริยาอัลกอฮอล์ไลซิสของ *P.fluorescens* PS สูงกว่าไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 ดังนั้นจึงได้ทดลองปรับปริมาณน้ำของไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 ให้เท่ากับ *P.fluorescens* PS แล้วทำปฏิกิริยาเอทานอลไลซิสน้ำมันปลาพบว่า ไลเปสทนความร้อนตรึงให้ปริมาณ ethyl EPA และ ethyl DHA มากกว่า ดังนั้นสรุปได้ว่าไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 เหมาะสมสำหรับที่จะใช้ในการเตรียม DHA และ EPA เข้มข้น โดยเอทานอลไลซิสของน้ำมันปลาที่คัดเลือกไว้

การศึกษาเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเอทานอลไลซีสน้ำมันปลาพุน่าไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 และ *P.fluorescens* PS ซึ่งมีการปรับปริมาณความจุน้ำของไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 ให้เท่ากับ Cw ของไลเปสตรึงจาก *P.fluorescens* PS และใช้แอกติวิตีรวมเท่ากับ 2171 ยูนิต จากการศึกษาพบว่าเมื่อให้เวลามากขึ้นไลเปสตรึงจาก *P.fluorescens* PS ให้ปริมาณ ethyl EPA และ ethyl DHA สูงขึ้นด้วย ส่วนไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 สามารถให้ปริมาณ ethyl EPA และ ethyl DHA สูงสุดใน 6 ชั่วโมงแรก และลดลงใน 6 ชั่วโมงต่อมาและค่อยๆ เริ่มคงที่ที่ชั่วโมงที่ 24 อาจเป็นไปได้ว่าใช้แอกติวิตีของไลเปสจาก pQE-TP811 น้อยเกินไปอันเนื่องมาจากไม่ได้เป็นเอนไซม์บริสุทธิ์ดังนั้นประสิทธิภาพในการเร่งจึงต่ำกว่าไลเปสตรึงจาก *P.fluorescens* PS ซึ่งเป็นไลเปสทางการค้ามีความบริสุทธิ์และประสิทธิภาพสูงกว่า ดังนั้นหากต้องการให้มีประสิทธิภาพในการไฮโดรไลส์ให้ใกล้เคียงกันต้องใช้แอกติวิตีโดยรวมของไลเปสจาก pQE-TP811 มากกว่าประมาณ 40 % ของแอกติวิตีรวมของไลเปสตรึงที่ได้จาก *P.fluorescens* PS จากข้อมูลข้างต้นมีแนวโน้มว่าหากใช้เวลานานขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณ ethyl EPA และ ethyl DHA สูงขึ้น ดังนั้นจึงได้ทำปฏิกิริยาเอทานอลไลซีสโดยปรับจำนวนแอกติวิตีรวมของไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 เป็น 4343 ยูนิต ซึ่งเป็น 2 เท่าของแอกติวิตีรวมของไลเปสตรึงจาก *P.fluorescens* PS พบว่าประสิทธิภาพในการไฮโดรไลส์ของไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 สูงกว่าไลเปสตรึงจาก *P.fluorescens* PS ซึ่งให้ผลผลิตสูงมากกว่า 10 เท่า หากต้องการใช้ไลเปสตรึงเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลส์น้ำมันปลาให้สมบูรณ์ต้องใช้เวลาในการทำปฏิกิริยายาวนานขึ้น

การทดลองหาอายุการใช้งานของเอนไซม์สามารถทำได้โดยการนำเอนไซม์ตรึงนั้นมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำหลายๆ รอบ และวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ในแต่ละรอบของการใช้งานโดยใช้แอกติวิตีของไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 307 ยูนิต และไลเปสตรึงจาก *P.fluorescens* PS 217 ยูนิต และปรับปริมาณ Cw ของไลเปสจาก pQE-TP811 ให้เท่ากับไลเปสตรึงจาก *P.fluorescens* PS โดยทำปฏิกิริยาที่ 37°C เวลาที่ 200 รอบ/นาที และทำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลคือเอนไซม์ไลเปสตรึงจาก pQE-TP811 ให้ปริมาณ ethyl EPA และ ethyl DHA สูงในรอบแรก (0.31 และ 1.49 มก./มล. ตามลำดับ) และค่อยๆ ลดลงในรอบต่อมาและได้ปริมาณค่อนข้างคงที่ที่รอบ 3 ไลเปสตรึงจาก *P.fluorescens* PS ให้ปริมาณ ethyl EPA และ ethyl DHA ในทำนองเดียวกันคือรอบแรกให้ปริมาณสูงและลดลงในรอบถัดมาส่วนรอบที่ 4-5 มี ethyl DHA น้อยมาก และไม่พบปริมาณ ethyl EPA ความสามารถในการทำปฏิกิริยาเอทานอลไลซีสของไลเปสทั้งสองลดลงอาจเป็นเพราะน้ำที่มีอยู่ในเอนไซม์อาจลดลงเนื่องจากถูกละลายไปกับเอทานอลที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาและการแยกผลิตภัณฑ์ออกไปในแต่ละครั้ง ดังนั้นจึงเติมน้ำลง

ในเอนไซม์ตรีงทั้งสองให้เท่ากับปริมาณที่เติมในรอบแรกแล้วจึงนำมาใช้งานในรอบที่ 6 พบว่าไม่ได้ทำให้แอกติวิตีของไลเปสตรีงจาก *P. fluorescens* PS เพิ่มขึ้นมากกว่ารอบที่ 5 และลดลงในการใช้งานในรอบที่ 7, 8, 9 และ 10 ส่วนไลเปสตรีงจาก pQE-TP811 หลังเติมน้ำแล้วนำมาใช้งานในรอบที่ 6 พบว่าแอกติวิตียังคงต่ำกว่ารอบที่ 5 แต่ไม่ลดลงในรอบต่อมา ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าปริมาณน้ำที่เติมในรอบที่ 6 ยังน้อยเกินไปและเติมน้ำซ้ำเกินไปน่าจะเติมตั้งแต่ในรอบที่ 2 การทดลองต่อไปจึงควรลองเติมน้ำในเอนไซม์ตรีงให้มากขึ้นโดยการเติมน้ำทุกครั้งที่น่ากลับมาใช้งานใหม่

#### 4.5 สรุปผลการทดลอง

น้ำมันปลาพุนาที่ได้จากการบีบอัดหัวปลาพุนาหนึ่งสูกมีปริมาณ DHA และ EPA มากและแหล่งสกัดมีปริมาณมากเหมาะสำหรับการใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียม DHA และ EPA เข้มข้นโดยปฏิกิริยาเอทานอลไลซิสโดยไลเปสตรีงจาก pQE-TP811 ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาเอทานอลไลซิสน้ำมันปลาของไลเปสตรีงจาก pQE-TP811 มากกว่าไลเปสตรีงจาก pQE-P1 ส่วนประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาเอทานอลไลซิสน้ำมันปลาเมื่อเทียบกับไลเปสตรีงจาก *P. fluorescens* PS ในปฏิกิริยาที่มีแอกติวิตีและปริมาณน้ำ  $C_w$  เท่ากันพบว่า pQE-TP811 มีประสิทธิภาพต่ำกว่า ไลเปสตรีงจาก *P. fluorescens* PS ซึ่งเป็นไลเปสทางการค้า ดังนั้นหากต้องการให้ไลเปสตรีงจาก pQE-TP811 มีประสิทธิภาพการไฮโดรไลส์ใกล้เคียงกันต้องใช้แอกติวิตีสสูงกว่าแอกติวิตีของไลเปสตรีง *P. fluorescens* PS อย่างไรก็ตามหากไลเปสจาก pQE-TP811 มีการพัฒนาให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นหรือปรับสภาวะในการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสมมากขึ้นอาจทำให้ไลเปสมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูงขึ้น เมื่อพิจารณาความสามารถในการไฮโดรไลส์น้ำมันปลาที่เป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่งพบว่าไลเปสนี้มีความสามารถในการตัดกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง และอาจเป็นไปได้ว่าไลเปสชนิดนี้อาจมีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 2 บนไตรกลีเซอไรด์ซึ่งไลเปสที่มีความจำเพาะที่ตำแหน่งที่ 2 นี้มีจำนวนน้อย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาทางด้านความจำเพาะของไลเปสชนิดนี้ในขั้นต่อไป เนื่องจากความสามารถดังกล่าว ไลเปสจาก pQE-TP811 จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ในการเตรียม DHA และ EPA เข้มข้นจากน้ำมันปลาในเชิงอุตสาหกรรมได้ดีหากมีการพัฒนาปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตลอดจนอายุการใช้งานไลเปสตรีง