บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5380116

ชื่อโครงการ : การผลิต conjugated linoleic acids จากน้ำมันเมล็ดทานตะวันโดยใช้ไลเปสร่วมกับ แบคทีเรีย *Lactobacillus*

ชื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระ ปิยธีรวงศ์ สังกัดมหาวิทยาลัยขอนแก่น

: รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล สังกัดมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

E-mail Address : weera@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : มิถุนายน 2553 – กุมภาพันธ์ 2558

การผลิต conjugated linoleic acids จากน้ำมันเมล็ดทานตะวันโดยใช้ไลเปสร่วมกับแบคทีเรีย *Lactobacillus* ในขั้นต้นได้ทำการคัดเลือกเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายของน้ำมัน พบว่าการใช้ไลเปสที่ผลิตจากยีสต์สามารถย่อยสลายน้ำมันได้มากกว่าการใช้ไลเปสจากแหล่งอื่น โดยเฉพาะการใช้ *Candida rugosa* lipase ในการย่อยสลายน้ำมันให้ระดับการย่อยสูงสุด คือร้อยละ 67.12 หลังจากนั้นจึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการดังกล่าว ปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้จะถูกคัดเลือกโดยใช้แผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลบางส่วน (Fractional factorial design) ซึ่งตัวแปรที่เกี่ยวข้องได้แก่ อัตราส่วนปริมาณของเอนไซม์ต่อน้ำมัน อัตราส่วนปริมาณของบัฟเฟอร์ต่อน้ำมัน ค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยา เมื่อวิเคราะห์ผลด้วยวิธีการทางสถิติ พบว่าทุกตัวแปรมีผลต่อระดับการย่อยสลายของน้ำมันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ยกเว้นอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา จากนั้นจึงประเมินสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการดังกล่าวโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ด้วยแผนการทดลอง central composite design พบว่าตัวแปรที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่ออัตราการย่อยสลายของน้ำมัน คือ อัตราส่วนปริมาณของเอนไซม์ต่อน้ำมัน อัตราส่วนปริมาณของบัฟเฟอร์ต่อน้ำมัน และค่าพีเอชเริ่มต้น ($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์สมการถดถอยพบว่าสมการที่ใช้ในการพยากรณ์มีความแม่นยำ ($p < 0.05$) และมีความเหมาะสม ($R^2 = 0.89$) นอกจากนี้เมื่อทำการทวนสอบสมการดังกล่าว พบว่าความคลาดเคลื่อนระหว่างระดับการย่อยสลายที่พยากรณ์ และระดับการย่อยสลายที่ได้จากการทดลอง มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 5 สภาวะที่เหมาะสมต่อระดับการย่อยสลายร้อยละ 76.06 ได้แก่ อัตราส่วนปริมาณของเอนไซม์ต่อน้ำมัน คือ 750.28 ยูนิตต่อกรัม อัตราส่วนปริมาณของบัฟเฟอร์ต่อน้ำมัน คือ 4.0 กรัมต่อกรัม พีเอชเริ่มต้นของปฏิกิริยา คือ 6.70 อุณหภูมิของปฏิกิริยา คือ 40 องศาเซลเซียส และเวลาในการทำปฏิกิริยา คือ 19 ชั่วโมง เพื่อปรับปรุงความบริสุทธิ์ของกรดลิโนเลอิกที่ได้จึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันมาเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วย

วิธีการ urea complex fractionation ทำให้ความบริสุทธิ์ของกรดลิโนเลอิกเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 70.07 การศึกษาลำดับต่อมานำแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 12 สายพันธุ์มาคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดคอนจูเกตลิโนเลอิกในอาหารเหลวชนิด De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) ที่มีองค์ประกอบของกรดลิโนเลอิก พบว่า *Lactobacillus plantarum* TISTR 543 สามารถผลิตกรดคอนจูเกตลิโนเลอิก เท่ากับ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงศึกษาผลของความเข้มข้นกรดลิโนเลอิกต่อการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกรดลิโนเลอิกทำให้แบคทีเรียลดการเจริญ โดยที่แบคทีเรียชนิดนี้จะสามารถเจริญได้ในอาหารเหลวชนิด MRS ที่มีความเข้มข้นของกรดลิโนเลอิกได้ถึงระดับ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาขั้นสุดท้ายคือการผลิตกรดคอนจูเกตลิโนเลอิกจากน้ำมันทานตะวันโดยการใช้ไลเปสร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าสามารถผลิตกรดคอนจูเกตลิโนเลอิกได้ 85.0 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมัน ดังนั้นกระบวนการเตรียมกรดคอนจูเกตลิโนเลอิกโดยกระบวนการทางชีวภาพจึงมีความเป็นไปได้ โดยข้อเสนอด้านการวิจัยในอนาคตคือ ควรปรับปรุงวิธีการเตรียมกรดลิโนเลอิกจากน้ำมันเมล็ดทานตะวันให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีความเหมาะสม ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต และวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวกรดคอนจูเกตลิโนเลอิกเพื่อเพิ่มผลผลิตของกระบวนการผลิตต่อไป

Keywords: Conjugated linoleic acids, ไลเปส, *Lactobacillus*, น้ำมันเมล็ดทานตะวัน, แบคทีเรียกรด แลคติก

Abstract

Project Code : MRG5380116

Project Title : Production of conjugated linoleic acids from sunflower oil by lipase couple with *Lactobacillus*

Investigator : Assistant Professor Weera Piyatheerawong, Khon Kaen University

: Associate Professor Aran Hanpongkittikun, Prince Songkla University

E-mail Address : weera@kku.ac.th

Project Period : June, 2010 – February, 2015

In present study, bioprocess for the preparation of conjugated linoleic acids (CLAs) was demonstrated. Initially, enzymatic preparation and enrichment of linoleic acid (LA) were examined. Enzyme screening for oil hydrolysis was investigated. The results indicated that using lipase from yeast as a biocatalyst exhibited the higher rate of oil hydrolysis than using lipases from other sources. Particularly, utilizing *Candida rugasa* lipase gave the highest hydrolysis rate of 67.12%. Then, optimization of the enzymatic process was performed. Several variables involving in the enzymatic process were screened to identify significant variables through fractional factorial design. The investigated variables were enzyme to oil ratio, buffer to oil ratio, initial pH, reaction temperature and reaction time. Statistical analysis indicated that most of the variables were statistically significant ($p < 0.05$) except for reaction temperature. Then, the optimal conditions for oil hydrolysis were examined. Response surface methodology, based on central composite design, was adopted. According to statistical analysis, the variables significantly affecting the degree of oil hydrolysis were buffer to oil ratio, enzyme to oil ratio and initial pH ($p < 0.05$). Regression analysis suggested that the predictive model was adequate precision ($p < 0.05$) and satisfactory level of coefficient of determination ($R^2 = 0.89$). In addition, verification of the statistical model suggested that difference between the predicted and actual values of the hydrolysis degree was less than 5%. The optimal conditions to obtain oil hydrolysis degree of 76.06% were achieved as the following conditions, enzyme to oil ratio of 750.28 U/g, buffer to oil ratio of 4.0 (w/w), initial pH of 6.70, reaction time of 19 h and reaction temperature of 40 $^{\circ}$C. In order to improve the purity of LA, the hydrolysate was enriched using urea complex fractionation. The purity of LA could be enriched to 70.07%. Consequently, the potential lactic acid bacteria (LAB) were selected to examine capability of CLA

production. 12 strains of the selected LAB were cultured in De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) broth supplemented with LA. *Lactobacillus plantarum* TISTR 543 was found to be an appropriate CLA producer. Content of CLA production from the LAB was 0.04 mg/mL. Then, the effect of LA concentration on growth of the LAB was evaluated. The results suggested that increase in concentration of LA deteriorated the growth and this bacterium was able to grow in MRS supplemented with LA concentration up to 2.0 mg/mL. Finally, production of CLAs from sunflower oil using lipase couple with the appropriate LAB was evaluated. Capability of CLA production from sunflower oil using this bioprocess was 85.0 mg/g. Therefore, bio-based preparation of CLAs from oil could be established. Forthcoming studies are required in order to enhance the capability of CLA production. For example, improvement of LA preparation from sunflower oil could be achieved using more suitable catalysts. Optimization of the reaction conditions for CLA production and the purification approach of the resulting CLAs could enhance productivity of the overall process.

Keywords: Conjugated linoleic acids, lipase, *Lactobacillus*, sunflower oil, lactic acid bacteria