ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแยกกรดอีรูซิคจากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa*

ชื่อผู้เขียน นางสาววิวรรณ ทินน้อย

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์: ผศ. ดร. นวลศรี รักอริยะธรรม ประธานกรรมการ
รศ. ดร. ด้วง พุทธศุกร์ กรรมการ
อ. ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์ กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการแยกกรดไขมันจากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยย่อยสลายด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 20% และวิเคราะห์กรดไขมันโดยวิธีโครมาโทกราฟีกาซ พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดให้ได้กรดไขมันอิสระมากที่สุด (44.08% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด) คือ 60 นาที และเมื่อศึกษาขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน พบว่าเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเมธิลเลชันที่เหมาะสมคือ 15 นาที ได้ % recovery เท่ากับ 94% เมื่อย่อยสลายด้วยสารละลายเบสในสภาวะที่เหมาะสม (สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 20% อุณหภูมิ 80^{o}C) พบกรดไขมันอิสระที่สามารถวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีกาซทั้งหมด 11 ชนิด (ปริมาณ 52.52% โดยน้ำหนัก) และพบปริมาณของกรดโอเลอิค กรดลิโนเลอิค และกรด อีรูซิคเท่ากับ 16.03 , 13.16 และ 10.78% โดยน้ำหนักของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด ตามลำดับ (หรือ 30.49, 24.97 และ 20.50% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระทั้งหมดโดยการไทเทรตพบว่ามีปริมาณเท่ากับ 55.49%

เมื่อย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* พบว่าเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ 50 ยูนิต ย่อยสลายที่อุณหภูมิห้อง (31 $\pm$1 ^{o}C) เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดโดยวิธีโครมาโทกราฟีกาซ พบกรดไขมัน 10 ชนิด (ปริมาณ 18.91%โดยน้ำหนัก) โดยพบกรดโอเลอิค กรดลิโนเลอิค และกรดอีรูซิคเท่ากับ 6.16, 3.35 และ 4.85% โดยน้ำหนักของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด ตามลำดับ (32.59, 17.71 และ

25.64%ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ) และวิเคราะห์โดยการไทเทรตพบกรดไขมันอิสระทั้งหมดเท่ากับ 20.69% โดยน้ำหนักของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด

จากการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวกากมัสตาร์ดและตรวจหาสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้ พบว่าเอนไซม์ไลเปส มีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 °C พีเอช 7.0 ในช่วงเวลา 30 นาที โดยมีค่าแอคติวิตีสูงที่สุดเท่ากับ 5.08 ยูนิตต่อ 1 มิลลิลิตรของสารสกัดเอนไซม์ เมื่อทำการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ในสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว และวิเคราะห์กรดไขมันทั้งหมดโดยวิธีโครมาโทกราฟีกาซพบกรดไขมัน 8 ชนิด (ปริมาณ 7.32% โดยน้ำหนัก) โดยพบกรดโอเลอิค กรดลิโนเลอิค และกรดอีรูซิคเท่ากับ 3.20 , 1.21 และ 0.64% โดยน้ำหนักของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดตามลำดับ (43.73, 16.51 และ 8.70% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ) และวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันโดยการไทเทรตพบว่ากรดไขมันมีปริมาณเท่ากับ 9.34% โดยน้ำหนักของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด

จากการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* และเชื้อ *Aspergillus* sp. ร่วมกับดีเทอร์เจนต์ 4 ชนิด ได้แก่ sodium dodecyl sulfate, sodium dodecylbenzene sulfonate, tetraethylammonium chloride และ dodecyltrimethyl ammonium bromide และวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีกาซพบว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ไลเปสร่วมกับดีเทอร์เจนต์ชนิด tetraethylammonium chloride และ dodecyltrimethylammonium bromide พบปริมาณของกรดไขมันมากขึ้นคิดเป็น 60 % โดยน้ำหนักน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีกาซ

จากการแยกกรดอีรูซิคออกจากกรดไขมันเจือปนชนิดอื่นจากการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* และเชื้อ *Aspergillus* sp. พบว่าสามารถแยกกรดอีรูซิคได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ -11 องศาเซลเซียสโดยใช้สารละลายน้ำผสมเอธานอล ในอัตราส่วน 3 : 1 โดยพบปริมาณกรดอีรูซิคเท่ากับ 31.75 และ 27.51% ของกรดไขมันทั้งหมดเมื่อย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* และเชื้อ *Aspergillus* sp. ตามลำดับ

Thesis Title	Isolation of Erucic Acid from Mustard Seed Oil by *Candida rugosa* Lipase
Author	Miss Raviwan Tinoi
M.S	Biotechnology

Examining Committee:	Asst. Prof. Dr. Nuansri	Rakariyatham	Chairman
	Assoc. Prof. Dr. Duang	Buddhasukh	Member
	Dr. Hataichanoke	Niamsup	Member

Abstract

Mustard seed oil was subjected to alkali hydrolysis, in order to isolate fatty acid. Mustard seed oil was hydrolyzed at 80°C by 20% sodium hydroxide for 60 minutes and analyzed by gas chromatography to obtain maximum free fatty acid which was 44.08% of mustard seed oil. The methylation fatty acids took 15 minutes and 94% of methyl ester produced was recovered. Then, mustard seed oil was hydrolyzed by alkali in optimized condition (20% NaOH at 80°C). The amount of fatty acids was determined by gas chromatography in methyl ester forms. Eleven kinds of fatty acid were found (52.52% of mustard seed oil) mainly oleic acid, linoleic acid and erucic acid (16.03, 13.16 and 10.78% of mustard seed oil or 30.49, 24.97 and 20.50% of total fatty acid, respectively). The amount of fatty acid determined by titration with sodium hydroxide was found to be 55.49% of mustard seed oil.

Isolation of fatty acid from mustard seed oil by commercial lipase from *Candida rugosa* was investigated. The mustard seed oil was hydrolyzed by 50 units of *Candida rugosa* lipase at room temperature (31 $\pm$1 °C) for 20 hours and analyzed by gas chromatography. About ten fatty acids were identified (18.90% of

mustard seed oil) and the amount of oleic acid, linoleic acid and erucic acid were found to be 6.16, 3.35 and 4.85% of mustard seed oil, respectively (32.59, 17.71 and 25.64% of total fatty acid, respectively). The amount of fatty acid as determined by titration with sodium hydroxide was found to be 20.69% of mustard seed oil .

Mustard seed oil was also hydrolyzed by *Aspergillus* sp. lipase which was produced from *Aspergillus* sp. growing in mustard cake extracted medium. Optimum condition for *Aspergillus* sp. lipase hydrolysis was at 37°C , pH 7.0 for 30 minutes. It was found that maximum activity of 5.08 units could be obtained from 1 ml of enzyme extracts. Mustard seed oil was hydrolyzed by *Aspergillus* sp. lipase in optimized condition and analyzed by gas chromatography. About eight kinds of fatty acid were identified (7.32% of mustard seed oil) and the amount of oleic acid, linoleic acid and erucic acid were found to be 3.20, 1.21 and 0.64% of mustard seed oil, respectively (or 43.73 , 16.51 and 8.70% of total fatty acid, respectively). The amount of fatty acid determined by titration with sodium hydroxide was 9.34% of mustard seed oil.

Mustard seed oil was hydrolyzed by lipases in 4 kinds of detergent solution i.e. sodium dodecyl sulfate, sodium dodedylbenzene sulfonate, tetraethylammonium chloride and dodecyltrimethylammonium bromide. It was found that, as determined by gas chromatography, yield of fatty acids using by lipases with tetraethylammonium chloride and dodecyltrimethylammonium bromide increased about 60% of mustard seed oil.

Erucic acid was isolated from mixed fatty acids hydrolyzed by *Candida rugosa* and *Aspergillus* sp. The optimum condition for isolation was -11 ^{o}C using aqueous ethanol (ratio 3 : 1) . It was found that amount of erucic acid from *Candida rugosa* and *Aspergillus* sp. lipase hydrolysis was 31.74 and 27.51% of total fatty acid, respectively.