กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. นิรมล ศากยวงศ์ และ ดร. พนิดา อุนะกุล ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้แนวความคิดและคำแนะนำในการดำเนินการวิจัย ตลอดจนการแก้ปัญหาต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ Dr. Cornelis Verduyn ที่ให้คำปรึกษาและให้คำแนะนำแก่ข้าพเจ้า รวมทั้ง ผศ .ดร. ชนัญ ผลประไพ ที่ช่วยเป็นกรรมการตรวจแก้และสอบวิทยานิพนธ์ และขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำงานวิจัย ทั้งการเก็บข้อมูล คำแนะนำและกำลังใจ ท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณอย่างสูงต่อคณาจารย์ที่ประสิทธิประสาทวิชาความรู้แก่ข้าพเจ้า จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยเฉพาะพระคุณของบิดาและมารดาที่ให้ความอุปการะและสนับสนุนให้กำลังใจมาตลอด

ขอขอบพระคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ (Biotec) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทดลอง วัสดุอุปกรณ์ รวมทั้งสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบริษัทธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช สำหรับตัวอย่าง acid oil, crude lecithin, และ deodorizer distillates ที่ทางบริษัทให้ความอนุเคราะห์เพื่อใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

เกวลี พงศาอัศวไพบูลย์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

พ.ศ. 2551

สารบัญ

หน้า

หน้าอนุมัติ ..... (1)
บทคัดย่อภาษาไทย ..... (2)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... (3)
กิตติกรรมประกาศ ..... (4)
สารบัญ ..... (5)
สารบัญตาราง .... (9)
สารบัญภาพประกอบ ..... (10)

บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความนำ 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและวารสารปริทรรศน์ 4
2.1 โครงสร้างและหน้าที่ของกรดไขมัน 4
2.1.1 โครงสร้างและระบบการเรียกชื่อกรดไขมัน 4
2.1.2 หน้าที่ของกรดไขมัน 6
2.2 ชีวเคมีของการสะสมไขมัน 7
2.3 การสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (PUFAs) 11
2.4 แหล่งของ ω-3 PUFAs ในปัจจุบัน 16
2.5 แหล่งของจุลินทรีย์ทางเลือกของแหล่งผลิต ω-3 PUFAs 17
2.6 จุลินทรีย์กลุ่ม Thraustochytrids 18
2.7 การผลิต DHA ของจุลินทรีย์ 19

หน้า

2.8 อุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันพืช 22

2.8.1 กระบวนการบีบน้ำมันออกจากเมล็ดพืช 23

2.9 กระบวนการทำให้น้ำมันบริสุทธิ์ 25

2.9.1 Degumming 25

2.9.2 Refining 26

2.9.3 การฟอกสีให้จางลง (Bleaching) 27

2.9.4 การกำจัดกลิ่น (Deodorization) 27

2.10 งานวิจัยที่ผ่านมา 29

2.10.1 ปัจจัยด้านสารอาหาร 29

2.10.1.1 แหล่งคาร์บอน 29

2.10.1.2 แหล่งไนโตรเจน 30

2.10.1.3 Trace elements และ Growth factors 30

2.10.2 ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม 30

2.10.2.1 ความต้องการเกลือ 30

2.10.2.2 อุณหภูมิ 31

2.10.2.3 pH 31

2.10.2.4 อายุของจุลินทรีย์ 32

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย 34

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 34

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี 34

3.2.1 อุปกรณ์ 34

3.2.2 สารเคมี 35

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 36

3.3.1 การคัดแยกจุลินทรีย์ 36

3.3.2 การสกัดและวิเคราะห์กรดไขมันจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้
จากธรรมชาติ 36

หน้า

3.3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมจากการเติมน้ำตาลกลูโคส..... 37
3.3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ 37
3.3.3.2 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส..... 38
3.3.4 ผลของ NaCl, Na_2SO_4 และ $MgSO_4$ 38
3.3.5 ผลของธาตุ (Elements) ที่เป็นองค์ประกอบหลักในเกลือทะเล 39
3.3.6 ผลของปริมาณ $MgSO_4$ และความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสม 40
3.3.7 การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้
กระบวนการผลิตน้ำมันพืช 40
3.3.7.1 ผลของการใช้ผลพลอยได้ต่อการเจริญและการผลิต DHA .. 40
3.3.7.2 ผลของการใช้ผลพลอยได้ร่วมกับน้ำตาลกลูโคส
ต่อการเจริญและการผลิต DHA 41
3.4 การวิเคราะห์ 42
3.4.1 การวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง 42
3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส 42
3.4.3 การสกัดและการวิเคราะห์กรดไขมัน 42
3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณ Na^+, Mg^{2+} 43
3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณ Cl^-, SO_4^{2-} 43

บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์ผลการทดลอง 44
4.1 การคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่ม *Schizochytrium* จากธรรมชาติ 44
4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต DHA 46
4.2.1 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 46
4.2.2 ผลของ NaCl, Na_2SO_4 และ $MgSO_4$ 54
4.2.3 ผลของธาตุ (Elements) ที่เป็นองค์ประกอบหลักในเกลือทะเล 58
4.2.4 ผลของปริมาณ $MgSO_4$ และความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสม 66

หน้า

4.3 การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้ (By-product) ในกระบวนการผลิตน้ำมันพืช 82
4.3.1 ผลของการใช้ผลพลอยได้ต่อการเจริญและการผลิต DHA 82
4.3.2 ผลของการใช้ผลพลอยได้ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญ และการผลิต DHA 98

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 117
รายการอ้างอิง 120
ภาคผนวก 127
ก. รายการคำย่อ 128
ข. สารเคมี 130
ค. วิธีการวิเคราะห์ 132
1. การวิเคราะห์กรดไขมัน 132
2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล 135
3. การวิเคราะห์หาปริมาณธาตุ (Elements) 138
3. การวิเคราะห์ไขมัน 140
ง. ข้อมูลการทดลอง 143
ประวัติการศึกษา 155

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ชื่อทางเคมีของกรดไขมันต่างๆ 5

2.2 แสดงปริมาณกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 20 อะตอมหรือมากกว่า ในจุลินทรีย์ทางทะเลที่คัดเลือกได้ 20

2.3 ลักษณะเฉพาะของผู้ผลิต single cell oil ที่ดี 22

2.4 ส่วนประกอบทางเคมีของเมล็ดพืชน้ำมัน 23

2.5 อุณหภูมิและความต้องการเกลือของ Thraustochytrids บริเวณ Antarctic, temperate, tropical หรือ subtropical 33

3.1 การออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial) โดยมี 3 ปัจจัยๆ ละ2 ระดับ คือ NaCl 0 และ 12 มิลลิโมลาร์ (mM), Na_2SO_4 0 และ 6 mM และ $MgSO_4$ 1 และ 10 mM เปรียบเทียบกับการใช้เกลือทะเลสังเคราะห์ 15 กรัมต่อลิตร 39

3.2 การออกแบบสภาวะการเลี้ยง *Schizochytrium* sp. BCC 25505 ด้วยอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส และปริมาณ $MgSO_4$ ต่างกัน 40

4.1 องค์ประกอบกรดไขมันของ *Schizochytrium* ที่คัดแยกได้จากป่าชายเลน 3 แหล่งในประเทศไทย 45

4.2 ผลของ Yield และ Volumetric Productivity ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ 53

4.3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Tests of Between-Subjects Effects) เพื่อศึกษาอิทธิพลของเกลือ ต่อการเจริญของ *Schizochytrium* sp. BCC 25505 .. 57

สารบัญภาพประกอบ

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างกรดไขมัน Docosahexaenoic acid หรือ DHA (ω-3) 6

2.2 วัฏจักร Citrate/malate cycle และ Cytosolic 'Transhydrogenase' cycle …….. 9

2.3 แสดงสมมติฐานของการสังเคราะห์กรดไขมัน 10

2.4 การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
และ Lower eukaryotes …… 14

2.5 การสร้าง DHA ผ่านทาง Polyketide synthase (PKS) ของการสังเคราะห์ใน
Schizochytrium sp. และ thraustochytrids ชนิดอื่นๆ ……. 15

2.6 กระบวนการผลิตและขั้นตอนการทำให้น้ำมันพืชบริสุทธิ์ 28

3.1 ขั้นตอนการคัดแยกจุลินทรีย์จากป่าชายเลน 37

4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทีย์ *Schizochytrium* sp. ที่คัดแยกได้จากป่าชายเลน
3 แหล่งในประเทศไทยเปรียบเทียบกับ *Schizochytrium* mangrovei Sk-02 44

4.2 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 47

4.3 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 48

4.4 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 49

รูปที่ หน้า

4.5 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 50

4.6 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30-150 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 51

4.7 ผลของปริมาณ NaCl, Na_2SO_4 และ $MgSO_4$ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 55

4.8 ผลของการเติม $MgSO_4$ 10 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 59

4.9 ผลของการเลี้ยงโดยไม่มีการเติม $MgSO_4$ 10 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 60

4.10 ผลของการเติมและไม่เติม $MgSO_4$ 10 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 61

4.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ Na^+ ที่เวลาต่างๆ ในอาหารที่มีการเติมและไม่เติม $MgSO_4$ 10 mM 62

4.12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ Mg^{2+} ที่เวลาต่างๆ ในอาหารที่มีการเติมและไม่เติม $MgSO_4$ 10 mM 63

4.13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ Cl^- ที่เวลาต่างๆ ในอาหารที่มีการเติมและไม่เติม $MgSO_4$ 10 mM 64

4.14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ SO_4^{2-} ที่เวลาต่างๆ ในอาหารที่มีการเติมและไม่เติม $MgSO_4$ 10 mM 65

รูปที่ หน้า

4.15 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$ 10 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 66

4.16 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$ 20 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 67

4.17 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$ 30 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 68

4.18 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$ 40 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 69

4.19 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$ 10 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 70

4.20 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$ 20 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 71

4.21 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$ 30 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 72

4.22 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$ 40 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 73

4.23 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$ 10 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 74

รูปที่ หน้า

4.24 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$ 20 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 75

4.25 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$ 30 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 76

4.26 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4$ 40 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 77

4.27 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ $MgSO_4$ ปริมาณ 10-40 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 78

4.28 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ $MgSO_4$ ปริมาณ 10-40 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 79

4.29 ผลของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ $MgSO_4$ ปริมาณ 10-40 มิลลิโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 81

4.30 ผลของการเติม acid oil 10 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 83

4.31 ผลของการเติม distillate 10 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 84

4.32 ผลของการเติม crude lecithin 10 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 85

4.33 ผลของการเติม acid oil 30 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 86

4.34 ผลของการเติม distillate 30 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 87

รูปที่ หน้า

4.35 ผลของการเติม crude lecithin 30 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 88

4.36 ผลของการเติม acid oil 50 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA …… 89

4.37 ผลของการเติม distillate 50 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA ….. 90

4.38 ผลของการเติม crude lecithin 50 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 91

4.39 ผลของ acid oil 10-50 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA ……... 92

4.40 ผลของ distillate ความเข้มข้น 10-50 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
TFA และ DHA 93

4.41 ผลของ crude lecithin ความเข้มข้น 10-50 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
TFA และ DHA ……. 94

4.42 ผลของการเติม acid oil, distillate และ crude lecithin ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร
ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA …….. 95

4.43 ผลของไขมันทั้งหมดในเซลล์แห้งที่เลี้ยงด้วย acid oil, distillate และ crude lecithin
30 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับผลพลอยได้ทั้ง 3 ชนิด 97

4.44 ผลของการเติม distillate 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น
15 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA ……. 99

4.45 ผลของการเติม acid oil 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น
15 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA ……. 100

รูปที่ หน้า

4.46 ผลของการเติม crude lecithin 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น
15 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 101

4.47 ผลของการเติม distillate 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น
30 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 102

4.48 ผลของการเติม acid oil 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น
30 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 103

4.49 ผลของการเติม crude lecithin 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น
30 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 104

4.50 ผลของการเติม distillate 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น
45 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 105

4.51 ผลของการเติม acid oil 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น
45 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 106

4.52 ผลของการเติม crude lecithin 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น
45 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 107

4.53 ผลของการเติม distillate 30 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 108

4.54 ผลของการเติม acid oil 30 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 109

4.55 ผลของการเติม crude lecithin 30 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 110

รูปที่ หน้า

4.56 ผลของการเติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 111

4.57 ผลของการเติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 112

4.58 ผลของการเติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 45 กรัมต่อลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA 113

4.59 ผลของการเติม crude lecithin 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมน้ำตาลกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ 1 และ 2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง TFA และ DHA..... 114