บทที่ 2

ทฤษฎีและวารสารปริทรรศน์

2.1 โครงสร้างและหน้าที่ของกรดไขมัน

2.1.1 โครงสร้างและระบบการเรียกชื่อกรดไขมัน

กรดไขมันประกอบไปด้วยธาตุคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) โดยการเรียงตัวของสายคาร์บอนจะต่อกันเป็นสายยาว (C10-C24) ปลายด้านหนึ่งจะเป็นหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) และปลายอีกด้านจะเป็นหมู่เมธิล ($-CH_3$) กรดไขมันมี 2 ประเภทคือ กรดไขมันอิ่มตัวคือ กรดไขมันที่ไม่มีพันธะคู่ในสายคาร์บอน ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวคือกรดไขมันที่มีพันธะคู่ 1 หรือมากกว่า 1 ในสายคาร์บอน ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป cis form และโครงสร้างของกรดไขมันจะมีระบบการเขียนเป็นแบบ X:Y โดยที่ X คือจำนวนคาร์บอนทั้งหมด และ Y คือจำนวนของพันธะคู่

ระบบการเรียกชื่อกรดไขมันมี 2 แบบ คือการนับจำนวนคาร์บอนเริ่มต้นจากปลายด้านคาร์บอกซิล พันธะคู่ตำแหน่งแรกจะถูกแสดงด้วย Δ และตามด้วยตำแหน่งของพันธะคู่ เ ช่น Oleic acid 18:1 (Δ9) หมายความว่ากรดไขมันชนิดนี้มีคาร์บอนทั้งหมด 18 อะตอม มีพันธะคู่ภายในโมเลกุล 1 พันธะ และพันธะคู่ตำแหน่งแรกถูกสร้างที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และ 10 จากปลายด้านคาร์บอกซิล แต่เมื่อมีการนับจำนวนคาร์บอนเริ่มต้นจากปลายด้านหมู่เมธิล พันธะคู่ตำแหน่งแรกจะถูกแสดงด้วย ω หรือ *n* และตามด้วยตำแหน่งของพันธะคู่ เช่น Docosahexaenoic acid (DHA) 22:6 ω-3 หมายความว่ากรดไขมันชนิดนี้มีคาร์บอนทั้งหมด 22 อะตอม มีพันธะคู่ภายในโมเลกุล 6 พันธะ และพันธะคู่ตำแหน่งแรกถูกสร้างที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 จากปลายด้านหมู่เมธิล จัดอยู่ในกลุ่มของ Omega-3 หรือ *n*-3 fatty acids ดังรูปที่ 2.1 และชื่อทางเคมีของกรดไขมันต่างๆ แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1

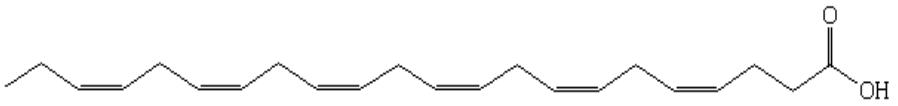
ชื่อทางเคมีของกรดไขมันต่างๆ

Common name	Abbreviation	Carbon Atoms	Double Bonds	Scientific Name	Sources
Butyric acid	C4:0	4	0	butanoic acid	butterfat
Caproic acid	C6:0	6	0	hexanoic acid	butterfat
Caprylic acid	C8:0	8	0	octanoic acid	coconut oil
Capric acid	C10:0	10	0	decanoic acid	coconut oil
Lauric acid	C12:0	12	0	dodecanoic acid	coconut oil
Myristic acid	C14:0	14	0	tetradecanoic acid	palm kernel oil
Palmitic acid	C16:0	16	0	hexadecanoic acid	palm oil
Palmitoleic acid	C16:1	16	1	9-hexadecenoic acid	animal fats
Stearic acid	C18:0	18	0	octadecanoic acid	animal fats
Oleic acid	C18:1n9	18	1	9-octadecenoic acid	olive oil
Ricinoleic acid	C18:1	18	1	12-hydroxy-9-octadecenoic acid	castor oil
Vaccenic acid	C18:1	18	1	11-octadecenoic acid	butterfat
Linoleic acid	C18:2n6	18	2	9,12-octadecadienoic acid	grape seed oil
Alpha-Linolenic acid (ALA)	C18:3n3	18	3	9,12,15-octadecatrienoic acid	linseed oil
Gamma-Linolenic acid (GLA)	C18:3n6	18	3	6,9,12-octadecatrienoic acid	borage oil
Arachidic acid	C20:0	20	0	eicosanoic acid	fish oil
Gadoleic acid	C20:1n9	20	1	9-eicosenoic acid	fish oil
Arachidonic acid (ARA)	C20:4n6	20	4	5,8,11,14-eicosatetraenoic acid	liver fats
Eicosapentaenoic acid (EPA)	C20:5n3	20	5	5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid	fish oil
Behenic acid	C22:0	22	0	docosanoic acid	rapeseed oil
Erucic acid	C22:1n9	22	1	13-docosenoic acid	rapeseed oil
Docosahexaenoic acid (DHA)	C22:6n3	22	6	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid	fish oil
Lignoceric acid	C24:0	24	0	tetracosanoic acid	small amount in most fats

ที่มา: (Ramwong, 2007, p. 6)

รูปที่ 2.1

โครงสร้างกรดไขมัน Docosahexaenoic acid หรือ DHA (ω-3)



Docosahexaenoic acid (22:6n-3), or DHA

2.1.2 หน้าที่ของกรดไขมัน

กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (Polyunsaturated fatty acids; PUFAs) จะแสดงบทบาทที่สำคัญมากมายต่อสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่ง DHA ซึ่งจะเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเซลล์เมมเบรนในเนื้อเยื่อมนุษย์ โดยจะพบ DHA มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดใน Rod outer segment ซึ่งเป็นส่วนของเซลล์ที่ใช้ในการรับภาพ (Photoreceptor) ในเรตินา (Qiu, 2003, p. 181 อ้างจาก Giusto et al., 2000, p. 321) ดังนั้น DHA จึงแสดงบทบาทในการเป็น Photoreceptor เช่น กระบวนการส่งสัญญาณ (Signal transduction processes) และการพัฒนา Rod และ Cone ซึ่งทางการแพทย์จะศึกษาผลของ DHA ต่อสายตาของทารกในครรภ์และทารก (Qiu, 2003, p. 181 อ้างจาก Uauy, Hoffman, Peirano, Birch D.G. & Birch E.E., 2001, p. 885) โดย DHA เป็นส่วนประกอบของเมมเบรนสมอง และมีความจำเป็นสำหรับการรักษาหน้าที่ปกติของระบบประสาทส่วนกลาง (Qiu, 2003, p. 181 อ้างจาก Crawford et al., 1997, p. 1033) ทำให้อาหารที่มีการเสริมด้วย DHA มีผลดีต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาสมองในทารก และมีความสำคัญสำหรับการรักษาหน้าที่ปกติของสมองในผู้ใหญ่ (Qiu, 2003, p. 181 อ้างจาก Martinetz, 1992, p. 130) นอกจากนี้ DHA ยังมีผลทางบวกต่อโรคบางชนิดเช่น ความดันโลหิตสูง ข้อต่ออักเสบ ผนังเส้นเลือดแดงหนาและมีความยืดหยุ่นน้อยลง โรคซึมเศร้า และเส้นเลือดตี บ (Qiu, 2003, p. 181 อ้างจาก Horrocks & Yeo, 1999, p. 211) ดังนั้นจึงมีการแนะนำให้รับประทานอาหารเสริมจำพวกกรดไขมันในปริมาณที่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งทารก เด็กวัยรุ่น และผู้สูงอายุหลังเกษียณ ให้ได้รับกรดไขมันนี้จากอาหารให้เพียงพอต่อร่างกาย เพราะร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ (Qiu, 2003, p. 181 อ้างจาก Spector, 1999, p. 1) นอกจากนี้ยังมีหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารกลุ่ม Eicosanoid เช่น Prostaglandins, Thromboxanes และ Leukotrienes และยังสามารถแสดงบทบาทด้านการส่งสารและความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเมมเบรน และ PUFAs ยังมีหน้าที่ในการควบคุมการ

แสดงออกของยีนจึงส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน และการควบคุมระดับคลอเรสเตอรอล นอกจากนี้ PUFAs ยังมีอิทธิพลต่อกิจกรรมทางชีวเคมีของเซลล์ กระบวนการขนส่ง การกระตุ้นและการตอบสนองของเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางสรีรวิทยารวมถึงเมตาบอลิซึมของไขมัน และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย

2.2 ชีวเคมีของการสะสมไขมัน

Oleaginous microorganism คือจุลินทรีย์ที่สามารถสะสมไขมันได้มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของมวลเซลล์ โดยที่การสะสมไขมันจะเกิดขึ้นได้ เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอ และการจำกัดปริมาณไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญของเซลล์ ดังนั้นไนโตรเจนจะหมดอย่างรวดเร็วในขณะที่แหล่งคาร์บอน (นิยมใช้น้ำตาลกลูโคสหรือคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ) จะถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์ไขมัน โดยจะสร้างในรูปของ Triacylglycerols เป็น Oil droplets ภายในเซลล์ และจะพบความแตกต่างระหว่างการสังเคราะห์กรดไขมันใน Oleaginous microorganism และจุลินทรีย์ทั่วๆ ไป 2 ข้อคือ

- ความสามารถในการผลิต Acetyl-CoA อย่างต่อเนื่องเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมันใน Cytosol
- ความสามารถในการผลิต NADPH อย่างเพียงพอ เพื่อใช้ในการรีดัคแตนท์สำหรับการสังเคราะห์กรดไขมัน

กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันจะเริ่มต้นจาก Acetyl-CoA โดยเอนไซม์ ATP: citrate lyase ACL เมื่อแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มหมด กล่าวคือเมื่อแหล่งไนโตรเจนเริ่มหมด กิจกรรมของ AMP deaminase ในเซลล์ Oleaginous จะสูงขึ้นถึง 5 เท่า ดังสมการที่ 2.1

$$\text{AMP} \xrightarrow{\text{AMP deaminase}} \text{inosine 5' – monophosphate} + NH_3 \quad \text{สมการที่ 2.1}$$

ปริมาณ AMP ภายในไมโตครอนเดรียจะลดลงเมื่อกิจกรรมของ AMP deaminase เพิ่มขึ้น ทำให้เอนไซม์ Isocitrate dehydrogenase ไม่ทำงาน เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์นี้จะขึ้นอยู่กับกิจกรรมของ AMP ดังนั้น Isocitrate จึงไม่สามารถเมตาโบไลต์ได้ จึงสะสมเป็น Citric acid (โดยเอนไซม์ Aconitase) และเมื่อมีการสะสมของ Citrate ในไมโตครอนเดรียขึ้น ทำให้ Citrate จะถูกส่งออกนอกผนังเมมเบรนของไมโตครอนเดรียโดยเอนไซม์ Citrate/malate

translocase (เพื่อเปลี่ยนเป็น Malate) เข้าสู่ Cytosol เพื่อเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA และ Oxaloacetate โดยเอนไซม์ ATP:citrate lyase (ACL) ดังสมการที่ 2.2

$$\text{Citrate} + \text{CoA} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{ACL}} \text{acetyl-CoA} + \text{oxaloacetate} + \text{ADP} + P_i \qquad \text{สมการที่ 2.2}$$

Acetyl-CoA จะถูกใช้เพื่อการสังเคราะห์กรดไขมัน และ Oxaloacetate จะถูกเปลี่ยนไปเป็น Malate โดยเอนไซม์ Malate dehydrogenase จากนั้น Malate จะถูกส่งออกไปที่ไมโตครอนเดรียโดยเอนไซม์ Citrate/malate translocase ซึ่งลำดับการสังเคราะห์จะแสดงในรูปภาพที่ 2.2

การสังเคราะห์กรดไขมันต้องการ NADPH อย่างเพียงพอเพื่อใช้เป็นรีดัคแตนท์ที่จำเป็นในการสังเคราะห์ เช่นการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอม 1 โมล ต้องการ NADPH 16 โมล โดยที่ NADPH 2 โมลจะถูกใช้เพื่อลด 3-keto-fattyacyl group ที่เพิ่มขึ้นมาจากทุกๆ ปฏิกิริยาการรวมกันของ Acetyl-CoA และ Malonyl-CoA ในกระบวนการที่สมบูรณ์ของสังเคราะห์กรดไขมัน (Standard fatty acid synthetase complex) ใน Saturated fatty acyl chain ซึ่งจะเข้าสู่วัฏจักรของการเพิ่มจำนวนคาร์บอนต่อไป โดย NADPH ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมันจะสร้างจากเอนไซม์ Malic ดังสมการที่ 2.3

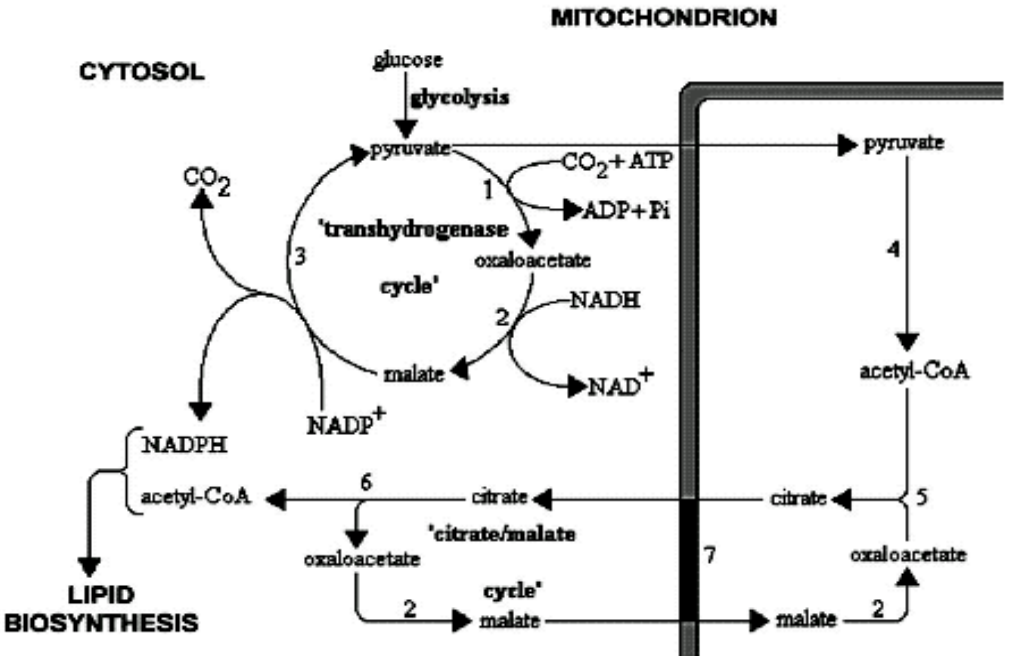
$$\text{Malic} + \text{NADP}^+ \longrightarrow \text{pyruvate} + CO_2 + \text{NADPH} \qquad \text{สมการที่ 2.3}$$

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Malic ใน Oleaginous microorganisms ซึ่งจะเกิดการรวมตัวกันด้วย ACL และ Fatty acid synthase (FAS) เพื่อเปลี่ยน Acetyl-CoA เป็นกรดไขมัน ซึ่งเมื่อถูก Esterified ด้วยกลีเซอรอลจะเปลี่ยนไปเป็น Triacylglycerols และรวมตัวกันโดย Endoplasmic reticulum เป็น Fatty acid droplets (Ramwong, 2007, pp. 13-16 อ้างจาก Ratledge, 2004, pp. 809-811) (รูปที่ 2.2)

จากรูปที่ 2.2 Acetyl-CoA และ CO_2 ถูกเปลี่ยนมาจาก Pyruvate และปฏิกิริยาการผลิต NADPH คือ $\text{NADH} + \text{NADP}^+ + \text{ATP} \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH} + P_i$ จากนั้น Citrate ในไมโตครอนเดรียจะเปลี่ยนไปเป็น Acetyl-CoA ใน Cytosol และเมื่อรวมกับ NADPH จะเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว และการทำให้กรดไขมันมีสายคาร์บอนยาวขึ้น

รูปที่ 2.2

วัฏจักร Citrate/malate cycle และ Cytosolic ‘Transhydrogenase’ cycle



ที่มา: (Ramwong, 2007, p. 15 อ้างจาก Ratledge, 2004, p. 810)

หมายเหตุ: 1. Pyruvate decarboxylase

2. Malate dehydrogenase

3. Malic enzyme

4. Pyruvate dehydrogenase

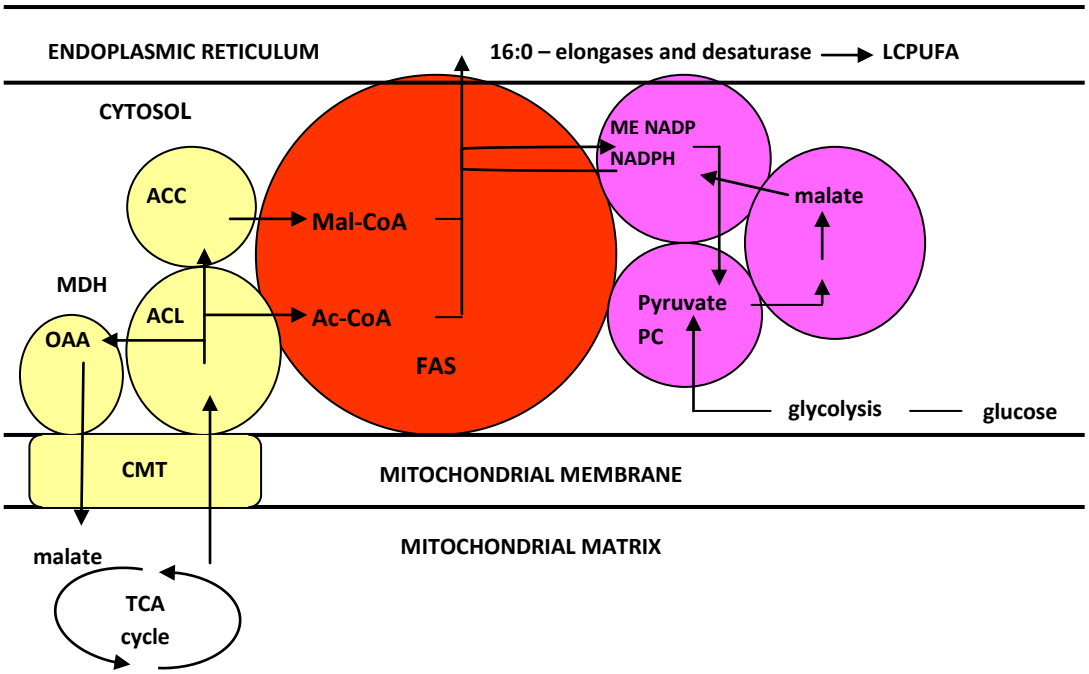
5. Citrate synthase

6. ATP:citrate lyase

7. Citrate/malate translocase

รูปที่ 2.3

แสดงสมมติฐานของการสังเคราะห์กรดไขมัน



ที่มา: (Ramwong, 2007, p. 16 อ้างจาก Ratledge, 2004, p. 811)

หมายเหตุ: OAA คือ oxaloacete

AC-CoA คือ acetyl-CoA

Mal-CoA คือ malonyl-CoA

FAS คือ fatty acid synthase

ACL คือ acetyl-CoA carboxylase

CMT คือ citrate/malate translocase

ME คือ malic enzyme

PC คือ pyruvate carboxylase

MDH คือ malate dehydrogenase

โดยเอนไซม์ ACC, ACL, OAA และ CMT จะพบในวัฏจักร citrate/malate cycle ส่วนเอนไซม์ ME และ PC จะพบในวัฏจักร cytosolic transhydrogenase cycle (แสดงในรูปที่ 2.2) โดยการไหลของคาร์บอนจากไมโตครอนเดรีย และ citrate จะไหลออกเพื่อสร้าง acetyl-CoA

ใน cytosol จากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (LCPUFA) ซึ่งจะเกิดขึ้นบริเวณเมมเบรนของ endoplasmic reticulum และระบบจะใช้ pyruvate (จาก glycolysis) เพื่อเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA และเข้าสู่ไมโตครอนเดรีย จากนั้นจะเกิดการสร้างกรดซิตริกขึ้นดังรูปที่ 2.2

2.3 การสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (PUFAs)

โดยปกติ PUFAs จะถูกสังเคราะห์ขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น (Precursors) คือกรดไขมันอิ่มตัว โดยเอนไซม์ Desaturase จะแทรกเข้าไปทำให้เกิดพันธะคู่ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่จำเพาะในกรดไขมัน และจะเข้าสู่ขั้นตอนการเพิ่มความยาวสายคาร์บอน (Elongation) ของกรดไขมันซึ่งคาร์บอนจะเพิ่มขึ้นครั้งละ 2 อะตอม

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Higher eukaryotes) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของ Eicosapentaenoic acid (EPA) ไปเป็น DHA ได้โดย Sprecher pathway ซึ่งจะผ่านขั้นตอนการ elongation 2 ครั้ง คือ 20:5n3 ไปเป็น 22:5n3 จากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็น 24:5n3 และเกิด Δ6 desaturation เปลี่ยนไปเป็น 24:6n3 สุดท้ายจะเกิดการ β-oxidation เพื่อผลิต 22:6n3 (รูปที่ 2.4)

ในทางตรงกันข้าม Lower eukaryotes เช่น *Pavlova* และ *Isochrysis* (Pereira, Leonard, Huang, Chuang & Mukerji, 2004, pp. 357-366) พบว่ากระบวนการเปลี่ยน EPA ไปเป็น DHA เกิดขึ้นได้โดยการ elongation ของ EPA ไปเป็น ω-3 DPA จากนั้นเอนไซม์ Δ4-desaturase จะเปลี่ยนให้เป็น DHA และจากงานวิจัยของ Metz และคณะ ในปี ค.ศ. 2001 พบว่าวิถีการสังเคราะห์ DHA แบบใหม่จากการทดลองใน Marine protist คือ *Schizochytrium* ซึ่งมีวิถีการสังเคราะห์คล้ายกับ PKS (Polyketide synthase) pathway รวมถึงการสังเคราะห์ PUFA ใน Prokaryotes (Metz et al., 2001, pp. 290-293) โดยวิถีการสังเคราะห์นี้แตกต่างจากกระบวนการ Elongation/Desaturation ซึ่งพันธะคู่จะถูกสร้างเข้าไปใน Acyl chain เดิม แทนที่จะถูกนำเข้าไปในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน ดังนั้นจึงเรียกว่า Anaerobic pathway สำหรับการสังเคราะห์ DHA (วิถีการสังเคราะห์แบบ “Anaerobic” ไม่ได้หมายความว่าวิถีการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อสิ่งมีชีวิตมีการเจริญแบบ Anaerobic เท่านั้น แต่ว่าออกซิเจนจะไม่ได้รวมอยู่ในการสังเคราะห์พันธะคู่ซึ่งจะเกิดขึ้นจากวิถีเดิมคือ desaturases ที่ใช้ในการผลิตพันธะคู่ในกรดไขมัน ดังนั้นออกซิเจนจึงไม่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ DHA ใน Eukaryotic marine protists)

นอกจากนี้ระบบการสังเคราะห์กรดไขมันแบบ PKS นี้จะพบว่าเกิดขึ้นในแบคทีเรีย *Shewanella* และ *Moritella marina* (*Vibrio marinus*) ซึ่งผลิต EPA และ DHA ตามลำดับ จาก

งานวิจัยของ Metz และคณะ ในปี ค .ศ. 2001 ทำการทดสอบอย่างน้อย 11 Fragments ใน 5 open reading frames (ORFs) ของชิ้นส่วนพันธุกรรม *Shewanella* ซึ่งคาดว่าเป็นเอนไซม์ที่น่าสนใจ และพบว่า 8 ใน 11 Fragments นี้มีความสัมพันธ์อย่างมากกับ PKS proteins ถึงแม้ว่า 3 Fragments ที่เหลือจะไม่พบ Homologous ของ Bacterial FAS proteins โดย 8 Fragments ของ PKS จะทำให้เกิดการสังเคราะห์ PUFA ซึ่งพบใน *Schizochytrium* sp. เช่นเดียวกับใน *Shewanella* ถึงแม้ว่าจะมีลำดับทางพันธุกรรมแตกต่างกัน นั่นคือ 3-ketoacyl synthase (KS) ซึ่งเป็นที่รู้จักว่าเป็น Condensing enzyme, Malonyl-CoA:ACP acyltransferase (MAT), Acyl carrier protein (ACP), 3-ketoacyl-ACP reductase (KR), Acyltransferase (AT), Chain length factor (CLF), Enoyl reductase (ER) และ Dehydrase/isomerase (DH) ดังนั้นการสังเคราะห์ DHA ใน Thraustochytrids จะพบการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวเกิดขึ้นโดยระบบ PKS ซึ่งคล้ายกับในแบคทีเรีย โดยการเพิ่ม Fatty acyl chain จะต้องไม่ไปลดกรดไขมันอิ่มตัวซึ่งจะเกิดขึ้นในระบบ FAS ของ Eukaryotic แบบเดิม แต่จะรวมถึง Fatty acyl intermediates ซึ่งยังคงเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ยังคงเพิ่มความยาวต่อไป (Ratledge, 2004, p.813 อ้างจาก Metz et al., 2001, pp. 290-293)

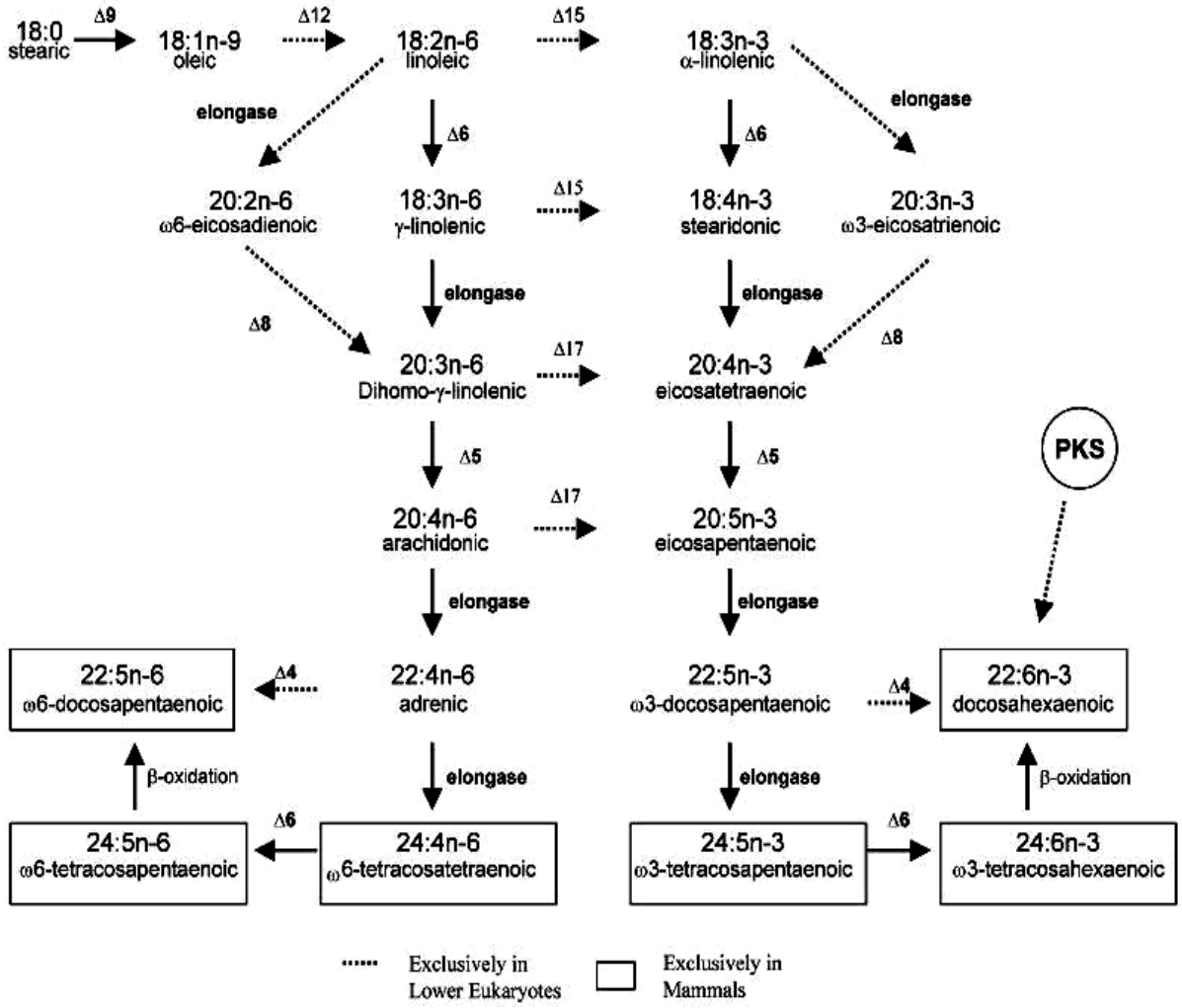
หน้าที่การสังเคราะห์ DHA โดย PKS pathway ใน *Schizochytrium* sp. และ Thraustochytrids ชนิดอื่นๆ ถูกแสดงไว้ในรูปที่ 2.5 โดยลำดับจะเริ่มต้นเมื่อมีการย้ายของ Acetyl-CoA และ Malonyl-CoA ด้วย ACP จากนั้นจะเกิดการรวมกันโดย KS หรือบางครั้งเรียกว่า Condensing enzyme เพื่อให้ได้ 3-ketobutyryl intermediate จากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็น Butyryl-ACP โดยการใช้ KR ต่อมาจะใช้ DH และสุดท้ายจะใช้ ER ซึ่งจะเท่ากับที่เกิดขึ้นในระบบการสังเคราะห์แบบ FAS เดิม อย่างไรก็ตามการเพิ่มอย่าง ต่อเนื่องของ Malonyl-CoA ใน Fatty acyl chain ทำให้พันธะคู่เกิดขึ้นโดย DH และถ้าลำดับการติดตามเส้นทางการสังเคราะห์กรดไขมันในแบคทีเรียซึ่งมีความสัมพันธ์กับวิถีการสังเคราะห์นี้จะพบว่าพันธะคู่จะเริ่มต้นในรูปของ *trans* configuration และอาจจะพบที่ตำแหน่ง 2 และ 3 ดังนั้นเอนไซม์ Isomerase จึงถูกคาดเดาว่าใช้ในการเปลี่ยนพันธะให้อยู่ในรูปของ *cis* configuration และมีการเคลื่อนย้ายไปอยู่ที่ตำแหน่ง 3 และ 4 พร้อมๆ กัน ตัวอย่างเช่น การเปลี่ยน 6:1 (n-4) ไปเป็น 6:1 (n-3) และการเพิ่มอย่างต่อเนื่องของ Malonyl-CoA จะทำให้สายคาร์บอนยาวขึ้นซึ่งทำให้เกิดพันธะคู่ที่ตำแหน่งขวา จะเห็นได้จากรูปที่ 2.5 หลังจากการสร้าง 8:1 (*cis*-5) จะได้ 10:2 (*cis*-4 และ *cis*-7) จากนั้นจะเปลี่ยนเป็น 12:3 (*c*3 *c*6 และ *c*9) ต่อมาเป็น 14:3 (5,8,11), 16:4 (4,7,10,13), 18:5 (3,6,9,12,15), 20:5 (5,8,11,14,17) และสุดท้ายจะได้เป็น DHA คือ 22:6 (4,7,10,13,16,19) และจากงานวิจัยของ Qiu

ในปี ค.ศ. 2003 ที่ทำการศึกษาการมีอยู่ของเอนไซม์ Δ4-desaturase เพื่อพิจารณาว่า 20:5 (n-3) เป็น Intermediate ซึ่งจะเปลี่ยนให้เป็น 22:5 (7,10,13,16,19) โดยเป็น substrate สำหรับ desaturase ตัวสุดท้าย อย่างไรก็ตาม เพื่อสร้าง 22:5 (n-6) ซึ่งพบใน Thraustochytrids จะมีอยู่ลำดับหนึ่งซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนดังรูปที่ 2.5 และชี้อยู่ด้านบนบริเวณ n-6 series ของกรดไขมัน (เริ่มต้นด้วย 10:1(*cis*-4)) ถูกสังเคราะห์ขึ้น โดยลำดับจะไม่รวมอยู่ใน Δ4-desaturase (Qiu, 2003, pp. 183-184)

วิถีการสังเคราะห์ ω-3 จะทำให้เกิดการผลิต EPA ซึ่งจะเกิดขึ้นใน Eukaryotes เป็นส่วนใหญ่ แต่จะมี Lower eukaryotes 2-3 ชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิต EPA ได้ และ Lower eukaryotes บางชนิดที่สามารถผลิต ω-6 intermediates เพื่อเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมัน ω-3 โดยเอนไซม์ ω-3 desaturase ทำให้เกิดการผลิต EPA ขึ้น จากนั้นจะเกิดกระบวนการเปลี่ยน EPA ไปเป็น DHA 2 ขั้นตอน แต่กระบวนการเปลี่ยน EPA ไปเป็น DHA ใน Higher eukaryotes จะเกิดขึ้นโดย Sprecher pathway และ Polyketide synthase pathway (PKS) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สนับสนุนการผลิต DHA ใน Lower eukaryotes บางชนิด

รูปที่ 2.4

การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและ Lower eukaryotes



ที่มา: (Leonard, Pereira, Sprecher & Huang, 2004, p.38)

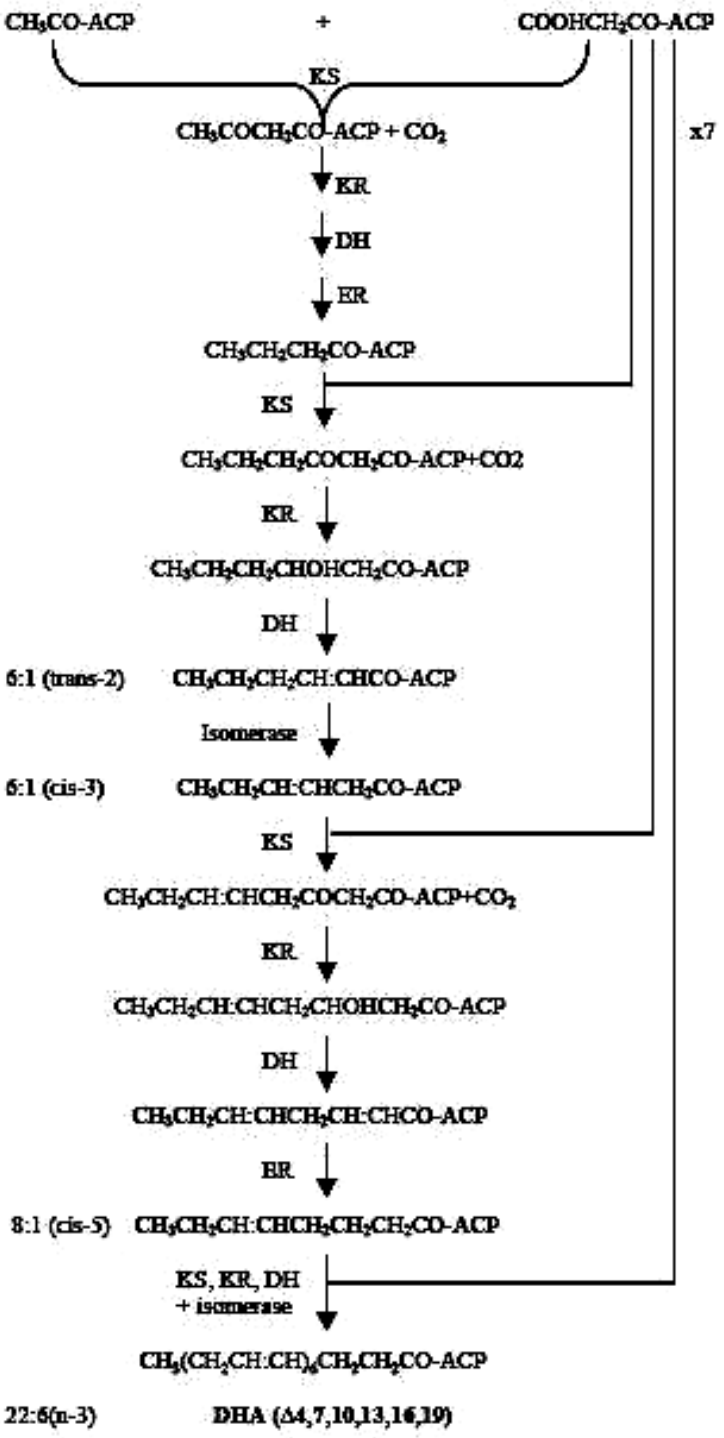
หมายเหตุ: ลูกศรเส้นทึบคือ วิถีการสังเคราะห์ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

ลูกศรเส้นประคือ วิถีการสังเคราะห์ที่พบใน Lower eukaryotes

กรอบสี่เหลี่ยมคือ กรดไขมันที่พบในวิถีการสังเคราะห์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

รูปที่ 2.5

การสร้าง DHA ผ่านทาง Polyketide synthase (PKS) ของการสังเคราะห์ใน *Schizochytrium* sp. และ Thraustochytrids ชนิดอื่นๆ



ที่มา: (Ratledge, 2004, p. 813)

2.4 แหล่งของ ω-3 PUFAs ในปัจจุบัน

เทคโนโลยีในปัจจุบันทำให้มีความเข้าใจเกี่ยวกับความสำคัญของ PUFAs ชนิดต่างๆ ในอาหารของมนุษย์และสัตว์ดียิ่งขึ้น ดังนั้นจึงมีการผลิตอาหารเสริมในระดับอุตสาหกรรมมากขึ้น โดยแหล่งทางการค้าของ PUFA-rich oils คือน้ำมันปลา ซึ่งพบการผลิตน้ำมันปลาทั่วโลกต่อปีคงที่ประมาณ 1.1 x 10^6 ตัน (Unagul, 2006, p. 12 อ้างจาก Gunstone, 2001) โดยที่ 80 เปอร์เซ็นต์ถูกใช้สำหรับการผลิตอาหารปลาสำหรับฟาร์มปลา (www.iffo.org.uk) และในปี 1996 ประเทศสหรัฐอเมริกามีการขายน้ำมันปลาทะเลเป็นอาหารเสริม 20 เปอร์เซ็นต์ จากทั้งหมด 55 ล้านเหรียญสหรัฐฯ ทำให้มีการสร้าง Outlets เพื่อขายอาหารสุขภาพ (Lewis et al., 1999, p. 584) ในขณะที่ 29 เปอร์เซ็นต์ (140 ล้านเหรียญสหรัฐฯ) ของตลาดทั้งหมดในแต่ละปีของประเทศอังกฤษ และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในระดับอุตสาหกรรมจะมีการเติม PUFA ลงในอาหาร 1-2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Rees, Cure, Piyatiratitivorakul, Sorgeloos & Menasveta, 1994) โดย The International Fishmeal and Oil Manufacturers Association (www.iffo.org.uk) ประมาณการว่าน้ำมันปลาที่นำมาใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำจะเพิ่มขึ้นถึง 1.1 x10^6 ตัน ในปี 2010 นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มหลายชนิดที่วางขายในท้องตลาดโดยเฉพาะอย่างยิ่งยุโรปและญี่ปุ่นจึงมีการเติม DHA หรือ PUFAs อื่นๆ เช่น ขนมปัง ไข่ และ soft drinks (Mukherjee, 1999)

ปัจจุบันตลาดการผลิตน้ำมันปลามีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และ Oil rich biomass เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ มีการเพิ่มคุณภาพให้ สูงในระดับ Food grade oils เพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหาร โภชนบำบัด และเมื่อมีกระบวนการทำให้น้ำมันมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น ทำให้สามารถผลิตกรดไขมันเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมยา ดังนั้นคาดว่าภายใน 10 ปี การผลิต PUFAs จากแหล่งนี้จะไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาดที่ขยายตัวเพิ่มขึ้น (Unagul, 2006, p. 13)

นอกจากนี้คุณภาพของน้ำมันปลายังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของปลา ฤดูกาล และที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ของตำแหน่งที่จับปลา (Gill & Valivety, 1997, p. 402) นอกจากนี้ลักษณะเฉพาะของรสชาติ กลิ่น และความซับซ้อนของกรดไขมันชนิดต่างๆ ในน้ำมันปลา จึงต้องผ่านกระบวนการต่างๆ หลายขั้นตอนเพื่อให้ได้น้ำมันบริสุทธิ์เช่น Fractional distillation Supercritical fluid extraction และ urea complexation โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยา (Belarbi, Molina & Chisti, 2000, p. 517) ดังนั้นน้ำมันปลาจึงมีข้อจำกัดหลายๆ อย่างสำหรับการผลิต ω-3 PUFA

2.5 แหล่งจุลินทรีย์ทางเลือกของแหล่งผลิต ω-3 PUFAs

จากความต้องการที่เพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ ω-3 PUFAs และได้มีรายงานเคยกล่าวไว้เกี่ยวกับจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรียทางทะเล ราและสาหร่ายเซลล์เดียว ประกอบไปด้วย PUFAs หลายๆ ชนิด ดังนั้น แบคทีเรียเหล่านี้อาจจะเป็นแหล่งผลิตที่เหมาะสมได้ ยิ่งไปกว่านั้นความหลากหลายของสายพันธุ์จุลินทรีย์ทำให้ง่ายต่อการคัดเลือกสายพันธุ์ในการผลิตน้ำมันที่มีกรดไขมันที่ต้องการ

จากการพิจารณาข้อดีหลายๆ อย่างของจุลินทรีย์ ทำให้มีการให้ความสนใจแ หล่งทางเลือกในการผลิต PUFAs นี้ โดยข้อดีของการใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิต PUFA มีดังนี้

1. จุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับผลิต PUFAs อาจจะขายได้ในราคาสูง
2. การผลิตสามารถดำเนินการได้ตลอดทั้งปี ไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล หรือสภาพภูมิอากาศ
3. การควบคุมปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและโภชนาการกระทำได้ง่ายกว่า
4. แหล่งจุลินทรีย์สามารถให้ PUFA ในปริมาณที่เพียงพอ
5. การใช้ Substrates ที่หลากหลายทำให้มีอัตราการเจริญสูงมาก โดยใช้วัตถุดิบราคาถูก
6. จุลินทรีย์จะอุดมไปด้วยโปรตีน แร่ธาตุ วิตามิน และแอนตี้ออกซิแดนซ์ ฯลฯ จึงสามารถใช้เป็นแหล่งโภชนาการในสูตรอาหารได้
7. ความรู้ทางด้านวิถีชีวเคมีและพันธุกรรมอาจจะเป็นเครื่องมือสำหรับการพัฒนาสิ่งใหม่ๆ ระบบการผลิตหรือผลิตภัณฑ์ที่น่าสนใจ

จากการศึกษาพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิต ω-3 PUFAs ตัวอย่างเช่น รา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Order Mucorales และแบคทีเรียใน Genera *Shewanella*, *Alteromonas*, *Flexibacter* และ *Vibrio* สามารถสะสม EPA ได้ค่อนข้างมาก (Gill & Valivety, 1997, pp. 402-405) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งของกรดไขมันสายยาวนี้ อย่างไรก็ตามความสามารถในกระบวนการหมักของแบคทีเรียและราเพื่อการแข่งขันในเชิงพาณิชย์โดยแหล่ง ω-3 PUFAs เดิม จะถูกจำกัดโดย productivity ต่ำ และใช้ระยะเวลาในกระบวน การหมักนาน (Barclay, Meager & Abril, 1994, p.124)

2.6 จุลินทรีย์กลุ่ม Thraustochytrids

Thraustochytrids จัดว่าเป็น heterotrophic marine protists อยู่ใน Kingdom Chromista, Phylum Labyrinthulomycota, Class Labryinthula, Subclass Thraustochytridea, Family Traustochytriaceae (Burja, Radianingtyas, Windust & Barrow, 2006) ซึ่งมีสมาชิกใน family อยู่ 9 genera คือ *Althornia*, *Aplanochytrium*, *Corallochytrium*, *Diphophrys*, *Japonochytrium*, *Labyrinthuloides*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* และ *Ulkenia* (Bahnweg, 1979, p. 245) โดย *Thraustochytrium* และ *Schizochytrium* จัดอยู่ในกลุ่ม thraustochytrids เนื่องจากสามารถผลิต PUFAs ได้หลายชนิด เช่น eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3), docosapentaenoic acid (C22:5 n-6) และ docosahexaenoic acid (C22:6 n-3) (Yamasaki et al., 2006, p. 323) โดยลักษณะพิเศษของจุลินทรีย์กลุ่มนี้คือ มีผนังเซลล์หลายชั้นที่ประกอบด้วย Sulfurylated L-galactose และ Biflagellate zoospores (Darley et al., 1973, p.89) และจากการวิเคราะห์ 18S rRNA ทำให้นักวิจัยบางท่านจัดจุลินทรีย์กลุ่มนี้อยู่ใน Phylum Heterokonta เนื่องจากมีลักษณะคล้ายคลึงกับ heterokont algae เช่น ไดอะตอมและสาหร่ายสีน้ำตาล (Fan,Jiang, Faan & Chen, 2007, p.2906 อ้างจาก Cavalier-Smith, Allsopp & Chao, 1994)

Thraustochytrids สามารถคัดแยกได้จากแหล่งที่หลากหลายทั่วโลกเช่น ทะเลสาบน้ำเค็ม ทะเล และป่าชายเลน นอกจากนี้ยังแสดงบทบาทสำคัญในการเพิ่มสารอาหารให้แก่ป่าชายเลนที่กำลังเสื่อมโทรม โดยทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายของเสียในป่าชายเลน เนื่องจาก จุลินทรีย์กลุ่มนี้จะใช้แหล่งคาร์บอนจากใบไม้ที่เริ่มเน่า (Burja et al., 2006) และยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายเช่น กลูโคส , ฟรุคโตส, กลีเซอรอล, starch, oleic acid และ linseed oil (Bajpai, Bajpai & Ward, 1991, p. 510) แหล่งไนโตรเจนที่ช่วยส่งเสริมการเจริญสำหรับจุลินทรีย์นี้ได้แก่ ผงยีสต์สกัด , corn steep liquor และแอมโมเนียมอะซิเตต (Yokochi, Honda, Higashihara & Nakahara, 1998, p.76)

Schizochytrium sp. จัดว่าเป็น Oleaginous microorganisms คือสามารถสะสมไขมันภายในเซลล์ได้ในปริมาณมาก และจากการศึกษาพบว่าไขมันภายในเซลล์ประกอบไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (PUFAs) จำนวนมาก (Jiang, Fan, Wong & Chen, 2004, p. 1196) โดย Thraustochytrids สายพันธุ์ที่ต่างกัน จะมีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่เท่ากัน โดยองค์ประกอบหลักของกรดไขมันทั้งหมดใน *Schizochytrium mangrovei* คือ Myristic acid (C14:0), Palmitic acid (C16:0), Docosapentaenoic acid (C22:5n6) และ Docosahexaenoic

acid (C22:6n3) และจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้สามารถผลิตกรดไขมันทั้งหมดได้สูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ Corn steep liquor ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน (Yaguchi, Tanaka, Yokochi, Nakahara & Higashihara, 1997, p. 1431)

2.7 การผลิต DHA ของจุลินทรีย์

สาหร่ายเซลล์เดียวและรา จะเป็นผู้ผลิตขั้นต้นของ ω-3 PUFAs ในห่วงโซ่อาหาร (Nichols, 2003, p. 2) และตัวอย่างของสาหร่ายเซลล์เดียวและราที่สามารถผลิต PUFAs จะแสดงในตารางที่ 2.2

จุลินทรีย์ที่เป็นผู้ผลิต DHA จะประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตประเภท Phototrophic และ Heterotrophic ซึ่งระบบการผลิตในเชิงพาณิชย์จะมีความแตกต่างกัน โดยสิ่งมีชีวิตประเภท Phototrophic ต้องการแสงเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน และใช้ CO_2 เป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นบ่อเปิดจึงเป็นระบบที่ง่ายที่สุดสำหรับจุลินทรีย์ประเภทนี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงสาหร่าย ถึงแม้ว่าระบบนี้จะดูเหมือนต้นทุนต่ำสำหรับการก่อสร้างและการดำเนินการ แต่กระบวนการผลิตขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ นอกจากนี้ยังพบปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนและต้นทุนในการแยกผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์มีต้นทุนสูง เนื่องจากความหนาแน่นของเซลล์ต่ำและข้อจำกัดเกี่ยวกับระบบการเลี้ยง ถึงแม้ว่าจะมีความพยายามในการแก้ไขข้อจำกัดต่างๆเช่น การขาด CO_2 การควบคุมอุณหภูมิ การระเหย และการปนเปื้อน ด้วยการใช้บ่อปิดหรือถังปฏิกรณ์ทางชีวภาพที่มีการปรับความเข้มแสงได้ แต่ก็ไม่สามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นได้หมด ดังนั้นการเลี้ยงสิ่งมีชีวิตประเภท Phototrophic สำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีราคาสูงจึงไม่เหมาะสม (Chen, 1996, p. 422)

แหล่งจุลินทรีย์ทางเลือกสำหรับผู้ผลิต DHA คือ สิ่งมีชีวิตประเภท Heterotrophic ซึ่งต้องการกลูโคสหรือแหล่งคาร์บอนอื่นๆ เป็นแหล่งพลังงาน โดยการเลี้ยงสิ่งมีชีวิตประเภท Heterotrophic มีข้อดีมากกว่าการเลี้ยง Phototrophic เช่นการเลี้ยง Heterotrophic ไม่ต้องมีต้นทุนทางด้านแสงและพลังงานไฟฟ้าที่จำเป็นในการเจริญของสาหร่ายชนิด Phototrophic ดังนั้นการผลิตจึงสามารถดำเนินงานได้ตลอดทั้งปีโดยไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาลหรือสภาพอากาศ และการผลิต Heterotrophic algal เพื่อให้ได้มวลเซลล์ด้วยเทคโนโลยีมาตรฐานจะใช้ต้นทุนน้อยกว่า 5 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม (Chen, 1996, pp. 422-423) ยิ่งไปกว่านั้นเทคโนโลยีเกี่ยวกับกระบวนการหมัก Heterotrophic เช่น การเลี้ยง แบบ Fed-batch, chemostat และระบบ Membrane cell recycle เพื่อให้ได้ความหนาแน่นเซลล์สูง (>100 g/L DW) (de Swaaf, Pronk & Sijtsma 2003, p. 41)

ตารางที่ 2.2
แสดงปริมาณกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 20 อะตอมหรือ
มากกว่าในจุลินทรีย์ทางทะเลที่คัดเลือกได้

Organisms	PUFAs (% Total fatty acids)		
	20:4	20:5	22:6
Thaustochytrium aureum (H)	3	-	52
Schizochytrium sp. (H)	-	-	30
Crythecodinium cohnii (H)	-	-	44
Amphidinium carterae (H)	-	4	2
Isochrysis galbana (P)	-	25	11
Skeletonema costatum (P)	-	41	7
Amphidinium sp. (P)	-	8	17
Pavlova lutheri (P)	-	12	7

ที่มา: (Unagul, 2006, p. 16)

หมายเหตุ: H คือ การเจริญแบบ Heterotrophic

P คือการเจริญแบบ Phototrophic

การพัฒนากระบวนการผลิต PUFAs จากจุลินทรีย์ จำเป็นต้องมีการเลือกสิ่งมีชีวิตที่เหมาะสมรวมถึงเทคนิคการเลี้ยงด้วย (Ward & Singh, 2005, p. 3641) จึงจำเป็นต้องมีรายละเอียดเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตและสภาวะการเลี้ยงเช่น ต้นทุนในการแยกผลิตภัณฑ์ให้ง่ายและมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ PUFAs ที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตทางทะเล จะทำการแยกจากแหล่งทะเล ซึ่งสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือต่ำและอุณหภูมิสูง โดยที่ลักษณะเฉพาะที่ สำคัญของผู้ผลิต PUFAs แสดงในตารางที่ 2.3

ปัจจุบันนี้มีกระบวนการผลิต DHA ในเชิงพาณิชย์ด้วยสิ่งมีชีวิตแบบ Heterotrophic อยู่ 3 ชนิด คือ *Crypthecodinium cohnii* (de Swaaf et al., 2003, p. 40) และสายพันธุ์ *Schizochytrium* (Barclay et al., 1994, p. 123) ในรูปของ Dinoflagellate micro-algae จัดว่าเป็น Marine protist ในกลุ่มของ Thraustochytrid family โดยสิ่งมีชีวิตทั้ง 2 นี้สามารถผลิตน้ำมันได้สูงถึง 40 เปอร์เซ็นต์ของมวลเซลล์ และ PUFAs ส่วนมากที่ผลิตได้คือ DHA

C. cohnii สามารถผลิต DHA ได้เปอร์เซ็นต์สูง (25-40 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ PUFAs อื่นๆ พบน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ของอนุพันธ์น้ำมัน (Harrington & Holz, 1968, p. 138) โดยน้ำมันที่ได้จาก *C. cohnii* (DHASCO) ถูกพัฒนาโดย Martek Biosciences เพียงบริษัทเดียว ซึ่งใช้เติมลงในสูตรอาหารทารกร่วมกับ Arachidonic acid หรือที่รู้จักกันคือ “Formulaid” และบริษัท Omega Tech Inc. ทำการพัฒนาน้ำมันที่ได้จาก *Schizochytrium* หรือที่รู้จักกันคือ “DHA Gold” และนอกจาก DHA แล้ว สายพันธุ์ *Schizochytrium* ยังสามารถผลิต ω-6 Docosapentaenoic acid (DPA) ได้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง และกรดไขมันเลขคี่ บางชนิดเช่น 15:0 ด้วย (Ratledge, 2004, p. 808) นอกจากนี้ในระบบของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่สามารถเปลี่ยน ω-6 DPA ไปเป็น DHA ได้ ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ของ ω-6 DPA อยู่ (Gawrisch & Aldho, 2002) และในปัจจุบันน้ำมันที่ได้จาก *Schizochytrium* ได้มีการนำมาใช้เติมลงในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มปริมาณ DHA ในเนื้อสัตว์และไข่ และจากการทดลองพบว่า DPA ไม่มีผลต่อการดูดซึม DHA ทั้งเด็กและผู้ใหญ่ ทำให้มีการนำน้ำมันที่ได้นี้ไปทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับผู้ใหญ่

นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งคือ *Ulkenia* จัดอยู่ใน Order Thraustochytriales เช่นเดียวกับ *Schizochytrium* โดยใช้ชื่อว่า “DHActive” ซึ่งถูกพัฒนาโดยบริษัท Nutrinova ประเทศเยอรมัน (Ratledge, 2004, pp. 808-809)

ตารางที่ 2.3

ลักษณะเฉพาะของผู้ผลิต single cell oil ที่ดี

ลักษณะเฉพาะของผู้ผลิต single cell oil ที่ดี
ผลิตน้ำมันที่มีความจำเพาะ
สามารถสะสมไขมันได้มาก
การเจริญแบบ Heterotrophic
สามารถเจริญได้ในที่ที่มีปริมาณเกลือต่ำ
สามารถเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิสูง (>30°C)
ผลิตไขมันทั้งหมดได้สัดส่วนสูงในผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ
ในผลิตภัณฑ์ไม่ควรมีปริมาณ PUFAs ต่ำ
สิ่งมีชีวิตไม่ควรมี pigment สีขาวหรือไม่มีสี
PUFA จะพบในรูปไตรกลีเซอไรด์
สิ่งมีชีวิตที่เป็นจุลินทรีย์ทะเลจะมีขนาดเล็กพอสำหรับการให้เป็นอาหารปลาเล็ก
น้ำมันต้องง่ายต่อการสกัดออกจากมวลเซลล์

ที่มา: (Ward & Singh, 2005, p. 3641)

2.8 **อุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันพืช**

น้ำมันที่ผลิตเพื่อใช้ในการบริโภคส่วนใหญ่ได้มาจากเมล็ดพืชบางชนิด ซึ่งรวมเรียกว่าเมล็ดพืชน้ำมัน (oilseed) แต่มีน้ำมันบางชนิดสกัดได้จากส่วนเนื้อเยื่อที่หุ้มเมล็ด (mesocarp) เช่น น้ำมันมะกอก และน้ำมันปาล์ม กรดไขมันที่พบในน้ำมันพืชที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สุดคือ กรดคาโพรนิก (C6:0) และที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากที่สุดคือ กรดบีฮีนิก (C22:0) และกรดอีรูซิก (C22:1) สำหรับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวมีทั้งชนิดที่มีพันธะคู่ 1 อันและที่มีพันธะคู่หลายอัน และน้ำมันจากเมล็ดพืชมีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายอันเป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลมากกว่าไขมัน จึงทำให้น้ำมันพืชมีจุดหลอมเหลวต่ำ ส่วนประกอบทางเคมีของเมล็ดพืชน้ำมันแสดงในตารางที่ 2.4

น้ำมันพืชที่มีคุณภาพดีจะมีสีเหลืองอ่อน การรีไฟน์น้ำมัน พืชด้วยด่างจะช่วยลดความเข้มของสีให้อ่อนลงได้ น้ำมันที่สกัดจากเมล็ด พืชที่ยังไม่แก่จัด หรือเมล็ดที่ยังมีสีเขียวอาจมีคลอโรฟิลล์ปนอยู่ในน้ำมันได้ ทำให้น้ำมันที่ได้มีสีเขียวซึ่งผิดไปจากปกติ นอกจากนั้นน้ำมันที่ได้

จากเมล็ดพืชที่มีคุณภาพต่ำ เช่นเมล็ดเสียหายเนื่องจากถูกทำลายด้วย แมลง หรือเมล็ดแตกจะทำให้น้ำมันที่สกัดได้มีสีน้ำตาล ซึ่งไม่สามารถเปลี่ยนสีให้เป็นสีปกติได้โดยวิธีการรีไฟน์และการฟอกสี สารฟอสฟาไตด์ ซึ่งสามารถแยกออกได้โดยการล้างด้วยน้ำ ส่วนที่ถูกแยกออกมาอยู่ในน้ำจะมีเลซิทินสูง จึงใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตเลซิทินในอุตสาหกรรม

ตารางที่ 2.4

ส่วนประกอบทางเคมีของเมล็ดพืชน้ำมัน

เมล็ดพืช	ปริมาณน้ำมัน (%)	ปริมาณโปรตีน (%)	ปริมาณเส้นใย (%)	ปริมาณความชื้น (%)	ปริมาณเถ้า (%)	จำนวนเมล็ดต่อกรัม
มะพร้าว	34.0	3.3	4.3	47.0	1.0	0
ข้าวโพด	3.6	8.0	2.5	16.0	1.2	3
เมล็ดฝ้าย	36.0	33.0	2.0	4.7	4.6	9
มะกอก	17.0	0.9	-	44.0	2.2	1
ปาล์ม	70.0	-	-	-	-	0
ปาล์ม เคอร์เนล	40.0	8.4	5.8	8.4	1.8	0
ถั่วลิสง	49.0	26.0	4.9	6.5	2.3	0
เรพสีด	40.0	23.0	6.7	7.5	4.5	180
ถั่วเหลือง	20.0	36.0	5.0	8.5	4.9	6
เมล็ดทานตะวัน	47.0	23.0	4.2	5.4	-	11

ที่มา: (Abraham & Hron, 1992)

2.8.1 กระบวนการบีบน้ำมันออกจากเมล็ดพืช มีขั้นตอนที่ควรกระทำดังนี้

1) *การคัดเลือกและทำความสะอาด* ก่อนนำเมล็ดพืชเข้าเครื่องบีบ ต้องคัดเลือกเอาเมล็ดอ่อน แตกหักเสียหาย หรือถูกทำลายทางกลออกไปเสียก่อน เพราะน้ำมันในเมล็ดเหล่านี้ อาจเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือไฮโดรไลซิสแล้ว หลังจากคัดเลือกเอาแต่เมล็ดที่ดี แล้วนำมาทำความสะอาดเพื่อแยกสิ่งแปลกปลอมออกเช่น เศษดิน ฝุ่น ก้อนอิฐ หรือก้อนหินเล็กๆ และส่วนของพืชที่ไม่ให้น้ำมันเช่น เศษเปลือก หรือเศษไม้ออกเสียก่อน โดยใช้ตะแกรงร่อนเอาสิ่งที่ใหญ่ และเล็กกว่าเมล็ดพืชออกไป จะได้เมล็ดพืชที่สะอาด

2) *การอบแห้งและการเก็บรักษา* เมล็ดพืชที่สะอาดแล้วหากต้องการเก็บรักษาไว้ระยะหนึ่งก่อนนำไปสกัดน้ำมันน้ำมัน ควรนำไปอบแห้งเพื่อลดความชื้น เพราะเมล็ดที่มีความชื้นสูงจะทำให้น้ำมันเกิดการหืนได้เร็วขึ้น

3) *การเอาเปลือกออกและบด* เมล็ดพืชที่สะอาดและแห้งแล้วจะถูกนำไปบด หรือทำให้แตกเป็นชิ้นเล็กๆ เพราะการบดทำให้ผนังเซลล์ของเมล็ดแตกออกและเพิ่มพื้นที่ผิว จะทำให้บีบเอาน้ำมันออกมาได้ง่าย แต่ต้องรีบกระทำโดยเร็ว หากปล่อยทิ้งไว้ให้สัมผัสกับอากาศเป็นเวลานานจะทำให้น้ำมันเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและไฮโดรไลซิสได้อย่างรวดเร็ว การบดที่ละเอียดอาจไม่เหมาะถ้าใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย เพราะการบดที่ละเอียดเกินไปจะทำให้เป็นผง และไปอุดทางเดินของสารละลายได้ง่าย ทำให้สารละลายไหลไม่สะดวก จึงควรบดให้ละเอียดพอประมาณหรืออัดเป็นแผ่นบางๆ

4) *การทำให้สุก* เมล็ดพืชบางชนิดหลังจากบดให้ละเอียดแล้ว จะนำไปนึ่งให้ร้อนเพื่อทำลายโปรตีนที่ผนังเซลล์ ทำลายเอนไซม์ไลพอกซิจิเนสและไลเพสที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ที่แตกระหว่างการบด ช่วยป้องกันไม่ให้ไปเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันและไฮโดรไลซิส ความร้อนยังช่วยลดความหนืดของน้ำมัน ทำให้น้ำมันไหลออกมาได้ง่าย การนึ่งจะขึ้นอยู่กับเวลา อุณหภูมิ ความชื้นของเมล็ดพืช และเครื่องมือที่ใช้บีบน้ำมัน การนึ่งโดยใช้ไอน้ำภายใต้ความดันต่ำจะให้ผลดีกว่าในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลพอกซิจิเนสในเมล็ดถั่วเหลือง นอกจากนี้ความร้อนยังช่วยทำลายเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งอาจทำให้น้ำมันเกิดหืนได้

5) *การบีบน้ำมัน* เครื่องมือที่ใช้บีบน้ำมันชนิดเครื่องอัดไฮดรอลิกจะให้ผลดีที่สุดโดยเฉพาะเมื่อใช้กับเมล็ดฝ้ายที่มีความชื้น 5-6 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเป็นเครื่องอัดแบบสกรู หากเป็นเมล็ดถั่วเหลืองควรมีความชื้นประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ มะพร้าวและเมล็ดงาควรมีความชื้นประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเมล็ดพืชมีความชื้นสูงจะทำให้มีน้ำมันเหลืออยู่ในกากมาก โดยกากที่เหลือจากการบีบด้วยเครื่องอัด ซึ่งมีน้ำมันเหลืออยู่นี้ จะถูกนำไปสกัดแยกเอาน้ำมันที่เหลือออกอีกครั้งหนึ่งโดยใช้วิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย หรืออาจส่งกากขายให้กับโรงงานทำอาหารสัตว์

การสกัดไขมันหรือน้ำมันออกจากวัตถุดิบโดยการใช้ตัวทำละลาย เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก และใช้สกัดน้ำมันออกจากเมล็ดพืชที่มีปริมาณน้ำมันต่ำ หรือสกัดน้ำมันออกจากกากที่เหลือจากการบีบด้วยเครื่องอัด ตัวทำละลายที่ใช้จะต้องไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ได้แก่ ไซโคลเฮกเซน เอทานอล และไตรคลอโรเอทิลีน การใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายจะทำให้น้ำมันที่ได้มีกลิ่นดีขึ้น แต่โปรตีนในกากถั่วเหลืองจะมีสมบัติเปลี่ยนไป มีผลทำให้น้ำมันมีคุณภาพ ลดลง การใช้ไตรคลอโร

เอทิลีนเป็นตัวทำละลาย จะทำให้ในกากถั่วเหลืองมีสารใหม่เกิดขึ้ นซึ่งเป็นสารพิษต่อสัตว์ ดังนั้นจึงนิยมใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายมากที่สุด

วิธีการสกัดทำได้โดยให้ตัวทำละลายไหลซึมผ่านเมล็ดที่บดละเอียด น้ำมันที่อยู่ในเมล็ดจะละลายออกมากับตัวทำละลาย เมื่อน้ำมันละลายออกมาหมดแล้ว นำไปกลั่นแยกเอาตัวทำละลายออกโดยการระเหยที่ความดันต่ำ ทำให้มีความชื้นเหลืออยู่น้อยกว่า 0.15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และได้น้ำมันออกมาประมาณ 98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณน้ำมันจะสูงกว่าวิธีอื่น โดยน้ำมันที่ได้ออกมาเป็นน้ำมันที่ไม่บริสุทธิ์ เรียกว่า Crude oil ซึ่งมีสารประกอบต่างๆ ปนอยู่มากมาย ต้องนำไปผ่านกระบวนการทำให้น้ำมันบริสุทธิ์ต่อไป

น้ำมันที่ได้จากการสกัดโดยการใช้ตัวทำละลาย จะมีสารประกอบต่างๆปนอยู่ ซึ่งสารต่างๆ เหล่านี้มีผลต่อสี กลิ่น และรสชาติของน้ำมัน โดยสารเจือปนบางชนิดมีสมบัติคล้ายไขมัน ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด สารประกอบเชิงซ้อนของไขมันและโปรตีน (fat-protein complex) คาร์โบไฮเดรต กรดไขมันอิสระ สารสีต่างๆ ไขหรือแวกซ์ กลีเซอร์ไรด์ที่มีจุดหลอมเหลวสูง และสารที่ให้กลิ่นต่างๆ เช่น แอลดีไฮด์ คีโตน และไฮโดรคาร์บอน และน้ำมันที่สกัดโดยการใช้ตัวทำละลาย อาจมีตัวทำละลายเหลือตกค้างอยู่ในน้ำมันที่ผลิตออกมาได้ ดังนั้นการใช้ อุณหภูมิสูงเพื่อไล่ตัวทำละลายออกไปให้หมด อาจทำให้น้ำมันได้รับความร้อนสูงเกินไปจนเกิดการสลายตัวเป็นสารประกอบอื่นๆ ที่ไม่พึงประสงค์ได้ ซึ่งสารต่างๆ เหล่านี้จำเป็นต้องกำจัดออกให้หมด

2.9 กระบวนการทำให้น้ำมันบริสุทธิ์

2.9.1 Degumming

น้ำมันที่ได้จากการสกัดโดยการใช้ตัวทำละลาย (Crude oil) ไม่ได้ประกอบด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอลเพียงอย่างเดียว แต่จะมีสารประกอบอื่นๆ เช่น ฟอสโฟลิพิด และโพลาร์ลิพิดอื่นๆ ซึ่งละลายได้ในน้ำปนอยู่ด้วย รวมเรียกว่า กัม (gums) จะทำให้น้ำมันที่ได้มีลักษณะข้นหนืด (gummy) สารนี้มีอยู่ในน้ำมันประมาณ 0.03-3.0 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันที่ดีจะต้องไม่มีสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่ไตรเอซิลกลีเซอรอลปนอยู่ ยกเว้นวิตามินอี ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีอยู่ในน้ำมันพืชตามธรรมชาติ

วิธีการ Degumming เป็นการล้างน้ำมันด้วยการเติมน้ำลงในน้ำมันประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับปริมาณของฟอสฟาไตด์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันนาน 30-60 นาที แล้วปล่อยทิ้งไว้ สารประกอบฟอสโฟลิพิดที่ละลายได้ในน้ำแต่ไม่ละลายในน้ำมัน จะแยกตัวออกไปละลายอยู่ในน้ำ หลังจากนั้นแยกออกจากน้ำมันได้โดยวิธีการกรอง หรือใช้เครื่อง

เหวี่ยง ซึ่งจะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเลซิทิน นอกจากใช้น้ำล้างพวกกัมออกแล้ว บางครั้งยังมีการเติมสาร Degumming agent เช่น กรดฟอสฟอริกหรือกรดซิตริกลงไปด้วย เพื่อช่วยแยกเอาฟอสโฟลิพิดที่ไม่ละลายน้ำให้ออกมาด้วย

2.9.2 Refining

การรีไฟน์ (Refining) เป็นกระบวนการที่ใช้แยกเอาพวกกรดไขมันอิสระและสารปนเปื้อนที่ไม่ละลายในน้ำมันออกจากน้ำมัน ซึ่งทำได้หลายวิธีเช่น

1) Pre-storage refining เป็นการแยกสารปนเปื้อนที่ไม่ละลายในน้ำมันออก โดยตั้งทิ้งไว้ให้อนุภาคต่างๆ ตกตะกอน แล้วกรองหรือใช้เครื่องเหวี่ยงแยกเอาสารปนเปื้อนออก น้ำมันที่ได้จะนำไปรีไฟน์ด้วยวิธีอื่นต่อไป

2) Steam refining ทำได้โดยการใช้ไอน้ำผ่านเข้าไปในน้ำมันร้อนๆ ที่อุณหภูมิ 260 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ที่ความดันต่ำ 1 มิลลิเมตรปรอท หรือภายใต้สุญญากาศ การทำวิธีนี้ต้องกำจัดก๊าซออกซิเจนออกให้หมดและกระทำภายในภาชนะที่ปิดสนิท ไอน้ำจะพากรดไขมันอิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำคือ มีจำนวนคาร์บอนน้อยกว่า 14 อะตอม ระเหยออกไป เป็นการกำจัดกลิ่นของน้ำมัน (Deodorization) พร้อมกันด้วย และยังช่วยกำจัดสารประกอบประเภทแอลดีไฮด์ คีโตนและสารระเหยอื่นๆ ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันจะทำลายสารเพอร์ออกไซด์และแคโรทีนอยด์ด้วย แต่มีข้อเสียคือ วิธีนี้ทำลายวิตามินอีด้วย ซึ่งป้องกันได้โดยการเติมสารต้านออกซิเดชัน วิธีนี้มักใช้กับน้ำมันที่มีกรดไขมันอิสระสูง กรดไขมันอิสระอาจถูกแยกออกจากน้ำมันโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำภายใต้สุญญากาศ น้ำมันที่ได้หลัง จากผ่านการรีไฟน์ด้วยไอน้ำแล้ว ต้องนำไปรีไฟน์โดยใช้ด่างต่อไป

3) Alkali refining (Caustic refining) เป็นการรีไฟน์โดยใช้ด่าง นิยมใช้กับน้ำมันที่มีกรดไขมันอิสระปนอยู่เพียงเล็กน้อย ด่างที่ใช้เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมคาร์บอเนต สารละลายด่างที่ใช้ควรมีความเข้มข้นประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ วิธีทำจะฉีดสารละลายด่างเข้าไปในน้ำมันที่มีอุณหภูมิ 75-85 องศาฟาเรนไฮต์ ที่กวนอยู่ตลอดเวลาเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสม่ำเสมอ แล้วเพิ่มความร้อนให้อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 130-185 องศาฟาเรนไฮต์ ปริมาณของสารละลายด่างที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณของกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในน้ำมัน ปฏิกิริยาของกรดไขมันอิสระกับสารละลายด่างจะได้สบู่เกิดขึ้น ซึ่งสบู่ไม่ละลายในน้ำมัน ถ้าใช้ด่างมากเกินไปจะทำให้เกิดการไฮโดรไลซิสที่โมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล ทำให้มีกรดไขมันอิสระถูกแยกออกมาในรูปของสบู่มากขึ้น ทำให้ได้ปริมาณน้ำมันบริสุทธิ์ (Refined oil) ลดน้อยลง

การรีไฟน์ด้วยด่างจะทำเพียงครั้งเดียว สบู่ที่ออกมาจะตกตะกอนอยู่ข้างล่าง ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการรีไฟน์น้ำมันพืชด้วยด่าง สบู่ที่เกิดขึ้นจะเรียกว่า Soapstock มักนำไปขายให้กับโรงงานสบู่ แต่บางครั้งก็นำไปทำปฏิกิริยากับกรดกำมะถันเจือจางเพื่อให้ได้ Acid oil แล้วนำไปขายให้กับโรงงานทำอาหารสัตว์

2.9.3 **การฟอกสีให้จางลง** (Bleaching)

การฟอกสีเป็นกระบวนการที่ใช้แยกเอาสารประกอบที่เป็นสารสีต่างๆ และสารที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งติดปนเปื้อนอยู่ในน้ำมันออกไป หรือทำให้มีปริมาณ ลดน้อยลง สารสีเหล่านี้ได้แก่ คลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ การแยกเอาสารประกอบที่เป็นสารสี ออกไปจะช่วยทำให้น้ำมันมีสีจางลง นอกจากนี้ยังช่วยลดปริมาณของโลหะ ฟอสฟาไตด์ กัม สบู่ และสารประกอบเพอร์ออกไซด์ลงได้อีกด้วย กระบวนการอื่นๆก็สามารถช่วยแยกสารสีออกไปได้เช่น การทำ รีไฟน์ด้วยด่างสามารถแยกเอาสารสีที่ละลายได้ในน้ำ หรือสารสีที่มีสมบัติเป็นกรด (Acidic pigment) ออกไปได้ น้ำมันที่ผ่านกระบวนการกำจัดกลิ่น ก็ช่วยแยกเอาพวกสารสีที่ระเหยได้ง่าย หรือกลั่นออกได้ด้วยไอน้ำ และพวกที่ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนออกไป สารสีที่ถูกทำลายไ ด้ง่ายด้วยความร้อนอาจจะสลายตัวกลายเป็นสารประกอบชนิดใหม่ซึ่งไม่มีสีได้ นอกจากนั้นปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจนจะช่วยทำลายสารสีที่ถูกรีดิวซ์ได้ง่ายอีกด้วย

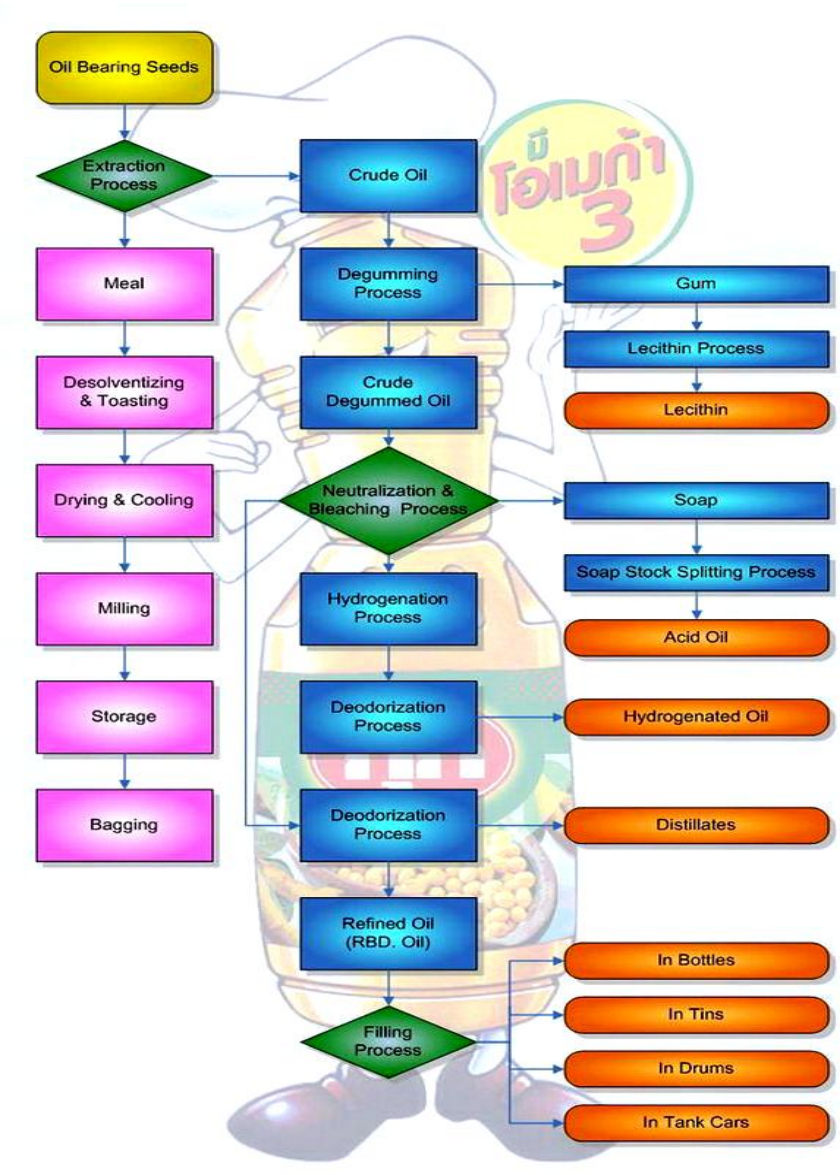
การฟอกสีทำได้ง่ายโดยใช้ Bleaching agent เติมลงไปในน้ำมันที่มีอุณหภูมิประมาณ 160-180 องศาฟาเรนไฮต์ ในถังที่มีเครื่องกวน เพิ่มอุณหภูมิให้ร้อนขึ้นอีกจนถึง 220-240 องศาฟาเรนไฮต์ นานประมาณ 20-30 นาที โดย Bleaching agent จะดูดซับพวกสารสีไว้ แล้วกรองเพื่อแยกเอา Bleaching agent ออก การใช้ Bleaching agent จะให้ผลดีในการกำจัดสีเขียวของคลอโรฟิลล์ สีแดงของแคโรทีนและแซนโทฟิลล์

2.9.4 **การกำจัดกลิ่น** (Deodorization)

การกำจัดกลิ่น (Deodorization) เป็นกระบวนการกำจัดสารที่ให้กลิ่นและรสชาติออกจากไขมันและน้ำมัน สาร ประกอบที่ถูกกำจัดออกไปจะเป็นพวกที่ระเหยได้เช่น กรดไขมันอิสระ แอลดีไฮด์ คีโตน เพอร์ออกไซด์ รวมทั้งพวกสเตอรอล แวกซ์ โมโนก ลีเซอไรด์ สารสีบางชนิด และสารประกอบที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน สารที่ให้กลิ่นเหล่านี้จะมีอยู่ในน้ำมันประมาณ 0.2-0.5 เปอร์เซ็นต์ และกระบวนการนี้ยังช่วยกำจัดสารพิษตกค้างจากยาปราบศัตรูพืช และสารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxin) ที่อาจปนเปื้อนออกไปได้ด้วย

วิธีการกำจัดสารที่ให้กลิ่น ทำได้โดยก ารเป่าไอน้ำร้อนลงไปในน้ำมันร้อน ที่อุณหภูมิประมาณ 200-260 องศาเซลเซียส (380-475 องศาฟาเรนไฮต์) ในภาชนะปิด ภายใต้สุญญากาศที่ความดัน 6-12 มิลลิเมตรปรอท อุณหภูมิที่ใช้ต้องไม่สูงเกินไป เพราะจะทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็นโพลิเมอร์ได้ ซึ่งผลพลอยได้จากกระบวนการนี้คือ Deodorizer distillates โดยกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองและขั้นตอนการทำให้น้ำมันบริสุทธิ์สรุปได้ดังรูปที่ 2.6

รูปที่ 2.6
กระบวนการผลิตและขั้นตอนการทำให้น้ำมันพืชบริสุทธิ์



ที่มา: http://www.cook.co.th/cook_process_flow.htm

2.10 งานวิจัยที่ผ่านมา

การผลิต DHA ในเชิงพาณิชย์ มีความจำเป็นต้องได้ความเข้มข้นของมวลเซลล์และ productivity ในระดับสูง เพราะ DHA เป็นผลิตภัณฑ์ภายในเซลล์ ดังนั้นจึงต้องการปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมหลายๆอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งองค์ประกอบทางเคมีของสารอาหารในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ อุณหภูมิ pH และอายุของจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ทั้งคุณภาพและปริมาณ

2.10.1 ปัจจัยด้านสารอาหาร

2.10.1.1 แหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์ *Schizochytrium* sp. สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด และพบว่า Monosaccharides โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลูโคสและฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพสำหรับ *S. limacinum* SR21 ขณะที่ di- และ polysaccharides จะให้ DHA ในระดับต่ำ และพบว่า glycerol จะช่วยส่งเสริมการเจริญและการผลิต DHA ที่ดี โดยระดับ DHA สูงที่สุดคือ 4.15 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้จาก *S. limacinum* เมื่อเลี้ยงโดยใช้ glycerol 12 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Oleic acid และ Linseed oil จะให้ความเข้มข้น DHA ต่ำ (Yokochi et al., 1998, pp. 72-76)

โดยทั่วๆ ไปแล้วพบว่า กลูโคสจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพสำหรับ *Schizochytrium* sp. โดย *Schizochytrium limacinum* SR21 จะผลิต DHA ได้มากกว่า 4 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีรายงานว่าระดับมวลเซลล์และความเข้มข้น DHA สูงสุดของ *Schizochytrium* sp. จะได้จากการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Ward & Singh, 2005, p.3639) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสจะทำให้การผลิตมวลเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรง นอกจากนี้พบว่างานวิจัยในปี 1999 มีการใช้น้ำมันถั่วเหลือง และผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันพืชมาเป็นแหล่งคาร์บอนแทนแหล่งคาร์บอนจำพวกคาร์โบไฮเดรตได้ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม (Cheng, Walker, Hulbert & Raman, 1999, pp. 101-102) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีการนำผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันพืชเช่น acid oil, deodorizer distillate และ lecithin มาใช้เป็นแหล่งสารอาหารต้นทุนต่ำเพื่อใช้ในการเลี้ยง *Schizochytrium* sp.

จากงานวิจัยในปี 2005 มีการนำเลซิทินซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง 0.5 เปอร์เซ็นต์ มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นเท่ากัน พบว่า Labyrinthulid สายพันธุ์ S3-2 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้เลซิทินเป็นแหล่งคาร์บอน โดยสามารถผลิต DHA ได้ถึง 6.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการใช้

น้ำมันถั่วเหลืองซึ่งสามารถผลิต DHA ได้เพียง 3.6 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นของเลซิทินตั้งแต่ 0.5 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสายพันธุ์นี้สามารถสร้าง กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวได้สูงสุดคือ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เลซิทิน 5 เปอร์เซ็นต์ (Kumon, Yokochi & Nakahara, 2005, pp. 256-257)

2.10.1.2 แหล่งไนโตรเจน

สารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สมบูรณ์เช่น ผงยีสต์สกัด และ corn steep liquor จะเป็นแหล่งส่งเสริมการเจริญที่ดี โดยจะได้ DHA yield สูงสุดคือ 1.7 กรัมต่อลิตร จากการเลี้ยง *S. limacinum* SR21 โดยการใช้ corn steep liqour 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้แอมโมเนียม อะซิเตตยังเป็นแหล่งไนโตรเจนจำพวกสารอนินทรีย์ที่ดีสำหรับ *S. limacinum* โดย DHA yield สูงสุดคือ 3.0 กรัมต่อลิตร จะได้จากการเติมแอมโมเนียมอะซิเตต 1.23 กรัมต่อลิตร (Yokochi et al., 1998, pp. 74-75) และจากงานวิจัยในปี 1973 ได้มีการศึกษาผลของการเติมเกลือแอมโมเนียมเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า *Thraustochytrium aureum* และ *T. kinnei* เจริญได้ไม่ดี (Goldstein, 1973, p. 162) ในขณะที่กลูตาเมตจะช่วยส่งเสริมการเจริญและการผลิต DHA ของ *T. aureum* และ *T. roseum* (Singh & Ward, 1996, p. 372)

2.10.1.3 Trace elements และ Growth factors

จากงานวิจัยในปี 1996 พบว่าไขมันในมวลเซลล์ของ *Schizochytrium* sp. สูงขึ้นถึง 2 เท่า เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่มีไอออนโลหะบางชนิดเช่น Fe^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} และ Mg^{2+} เปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีไอออนโลหะ (Singh & Ward, 1996, p. 372) นอกจากนี้ *Schizochytrium* sp. ยังต้องการวิตามินเพื่อใช้เป็น growth factors เช่น วิตามินบี 12 (Cobalamine) และบี1 (Thiamine) (Bahnweg, 1979, p. 260) โดยมีการศึกษาอิทธิพลของวิตามินต่อการเจริญของ *T. aureum* พบว่ามวลเซลล์สูงที่สุดคือ 18 กรัมต่อลิตร จากอาหารที่ประกอบด้วย Thiamine, Cobalamine, Pantothenic acid, Nicotinic acid, Riboflavin และ Biotin (Iida et al., 1996, p. 76)

2.10.2 ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม

2.10.2.1 ความต้องการเกลือ

Thraustochytrids เป็นสิ่งมีชีวิตที่พบตามแหล่งทะเล ดังนั้นจึงมีคว ามต้องการโซเดียมไอออนในการเจริญ (Bahnweg, 1979, p. 245) โดยระดับความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญของสายพันธุ์ *Schizochytrium* จะอยู่ในช่วง 1.5-3 เปอร์เซ็นต์ (หรือ 15-30 ‰) ในขณะที่

Thraustochytrium sp. จะอยู่ในช่วง 22.5-30 ‰ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Leano, Gapasin, Polohan & Vrijmoed, 2003, p. 117) ซึ่งความต้องการเกลือของ Thraustochytrids จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ (Antarctic, temperate และ subtropical) ดังแสดงในตารางที่ 2.5 โดยทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในความเค็มช่วง 0.5-3.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ก็มีบางสายพันธุ์ เช่น *Thraustochytrium aureum* และ *Schizochytrium aggregatum* ที่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเค็ม 0.1 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีการเจริญเมื่อศึกษาด้วยอาหารที่เตรียมจากน้ำกลั่น (Bahnweg, 1979, p. 255) อย่างไรก็ตามงานวิจัยในปี 1998 ได้ศึกษาการเจริญของ *S. limacinum* SR21 ด้วยอาหารที่ไม่มีเกลือ พบว่าปริมาณมวลเซลล์ที่ได้ลดลงเกือบครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับการเติมน้ำทะเล 50 เปอร์เซ็นต์ (Yokochi et al., 1998, p. 73) และจากงานวิจัยในปี 1994 ได้มีการแนะนำให้ใช้โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) เป็นแหล่งทางเลือกของโซเดียมเพื่อใช้ในการเจริญของ Thraustochytrids เพื่อผลิต PUFA rich oil และหลีกเลี่ยงการกัดกร่อนเหล็กของถังหมักด้วย (Barclay et al., 1994, p. 127)

2.10.2.2 อุณหภูมิ

Thraustochytrids สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิที่ค่อนข้างกว้าง แต่ที่เหมาะสมคือ 25 องศาเซลเซียส (Yokochi et al., 1998, p. 75) โดยอุณหภูมิที่ใช้จะขึ้นอยู่กับแหล่งภูมิอากาศที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2.5 และจากการทดลองโดยการใช้ *T. aureum* พบว่าปริมาณไขมันของมวลเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นถึงเกือบ 3 เท่า จาก 1.9 เป็น 4.3 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 15 เป็น 28 องศาเซลเซียส ในขณะที่ปริมาณไขมันของมวลเซลล์จะลดลงจาก 4.3 เป็น 1.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 28 เป็น 31 องศาเซลเซียส นอกจากนี้การเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยเพิ่มปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว เนื่องจากจุลินทรีย์มีการรักษา fluidity ภายในเซลล์ (Bajpai et al., 1991, pp. 510-511)

2.10.2.3 pH

Thraustochytrids สามารถเจริญในช่วง pH ที่ค่อนข้างกว้างคือ 5.0-11.0 แต่ที่เหมาะสมคือ 6.0-8.0 (Bahnweg, 1979, p. 249) และสายพันธุ์ *Schizochytrium* จะเจริญได้ดีที่ pH เริ่มต้นในช่วง 4.0-9.0 แต่ *Ulkenia* ไม่สามารถเจริญได้ที่ pH 4.0 (Fan, Vrijmoed & Jones, 2002, p. 55) และ *Schizochytrium* sp. S31 สามารถสะสมปริมาณไขมันได้สูงสุดถึง 40 เปอร์เซ็นต์ของมวลเซลล์ และปริมาณ DHA 13 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของไขมัน เมื่อเลี้ยง ด้วยอาหารที่มี pH 7 (Wu, Yu & Lin, 2005, p. 3103) อย่างไรก็ตาม pH เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับ

การผลิต DHA จะอยู่ในช่วง 6.0-7.0 เมื่อเลี้ยงด้วยสายพันธุ์ *Thraustochytrium*, *T. roseum* ATCC 2810, *Thraustochytrium* sp. ATCC 20892 (Singh & Ward, 1996, p. 372) นอกจากนี้ pH เริ่มต้นจะมีผลเล็กน้อยต่อการสร้างมวลเซลล์ ยกเว้นอัตราการเจริญของ *T. aureum* ที่ pH เริ่มต้นในช่วง 5.5-8.0 แต่จะไม่พบการเจริญเมื่อ pH สูงกว่า 8.0 (Iida et al., 1996, p. 76) อย่างไรก็ตาม pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต DHA คือ pH 6.0 (Bajpai et al., 1991, p. 509)

2.10.2.4 อายุของจุลินทรีย์

อายุของจุลินทรีย์มีอิทธิพลต่อการผลิตไขมัน โดยการสะสมไขมันจะเริ่มต้นเมื่อไนโตรเจนหมดซึ่งตรงกับช่วงท้ายของการเจริญ (Viljoen, Kock & Lategan , 1986, p. 1896) เมื่อจุลินทรีย์มีอายุเพิ่มขึ้นจะเริ่มมีการเก็บสะสมแหล่งพลังงานในรูปของไขมัน และจากสัดส่วนของกรดไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวจากกรดไขมันทั้งหมดเมื่ออยู่ในช่วง Stationary phase จะสูงกว่าการเจริญในช่วงอื่นๆ และ ในปี 2004 มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันของ *Schizochytrium mangrovei* 3 สายพันธุ์ และ Thraustochytrids ที่ใช้ในการผลิตเชิงพาณิชย์อีก 2 สายพันธุ์คือ *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185 และ *Schizochytrium* sp. ATCC 20889 พบว่าจะมีช่วง Stationary phase ที่แตกต่างกัน โดยมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันเล็กน้อยทั้ง 5 สายพันธุ์ และสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวและ DHA จะเพิ่มขึ้น 1-2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้นจาก 3 วันเป็น 5 วัน (Jiang et al., 2004, pp. 1196-1198)

ตารางที่ 2.5

อุณหภูมิและความต้องการเกลือของ Thraustochytrids บริเวณ

Antarctic, temperate, tropical หรือ subtropical

สายพันธุ์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		ความเค็ม (‰)	
	ช่วงอุณหภูมิ	ช่วงที่เหมาะสม	ช่วงความเค็ม	ช่วงที่เหมาะสม
Antarctic species				
Thraustochytrium antarcticum	0-17	4-9	5-35	15-30
Thraustochytrium kerguelensis	0-17	4-9	15-35	20-30
Thraustochytrium rossii	0-17	4-9	15-35	15-20
Temperate species				
Althornia crouchii	20-30	30	15-35	30-35
Labyrinthuloides haliotidis	5-24	5-15	15-45	30
Thraustochytrium aureum	4-30	20-25	5-35	20-35
Thraustochytrium motivum	4-37	12-25	5-35	25-35
Thraustochytrium multirudimentale	4-37	15-25	10-35	25-35
Thraustochytrium roseum	4-30	25-30	5-35	25-35
Tropical/Subtropical species				
Schizochytrium mangrovei	15-30	25	0-30	22.5-30.0
Thraustochytrium striatum KF-9	15-30	25	0-30	15-30
Ulkenia sp. KF-13	15-30	25	0-30	15-30
Schizochytrium limacinum	10-35	25	0-30	15-30

ที่มา: Unagul, 2006, p.24 อ้างจาก Fan et al., 2002, p. 55)