

ลี ที หุย ทริน : กระบวนการผลิตและทำให้บริสุทธิ์ของกรดไขมัน โอเมก้า 3 จาก *Pichia pastoris* โดยใช้ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันและเทคนิคการกลั่นระดับ โมเลกุล (PRODUCTION AND PURIFICATION OF OMEGA-3 FATTY ACIDS FROM *Pichia pastoris* USING TRANS-ESTERIFICATION AND MOLECULAR DISTILLATION TECHNIQUES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ บุญทาวัน, 76 หน้า

ทำการศึกษาหาสูตรอาหารในการเลี้ยง *Pichia pastoris* ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมให้สามารถผลิตกรดไขมัน โอเมก้า 3 เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ชีวมวลสูงสุดโดยใช้ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับเกลือแอมโมเนียม เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยใช้โปรแกรมออกแบบ Box-Behnken โดยมี 3 ปัจจัย และ 3 ระดับ เพื่อหาระดับที่เหมาะสมของกลีเซอรอล ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ พบว่า องค์ประกอบที่เหมาะสมคือ กลีเซอรอล 40 กรัม ต่อลิตร $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 กรัมต่อลิตร และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 7 กรัมต่อลิตร สูตรอาหารนี้ถูกนำไปใช้ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 500 ลิตร โดยควบคุมปริมาณ ออกซิเจนละลายอยู่ที่ 30-40 % ในวันที่ 1-3 และหลังจากนั้นลดปริมาณออกซิเจนละลายลงเหลือ 8-10 % จากนั้นในวันที่ 7 ทำการเก็บชีวมวล โดยใช้การกรองระดับไมโครและการปั่นเหวี่ยง ซึ่งได้ เซลล์แห้ง 4.367 กรัมต่อลิตร เซลล์ที่ได้ถูกนำไปใช้กระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย หรือ การทำแห้ง แบบแช่เยือกแข็ง พบว่า การทำแห้งแบบแช่เยือกให้ผงเซลล์ยีสต์ที่มีคุณภาพสูง หลังจากนั้น ผงยีสต์ แห้งถูกนำไปทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันกับเมทานอล เพื่อเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ให้อยู่ในรูป เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAME) การทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ทำให้สามารถเก็บ FAME ได้ถึง 70% และสามารถข้ามขั้นตอนการสกัดด้วยสารละลายเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชันของกรดไขมัน โอเมก้า 3 ในขั้นสุดท้ายได้ใช้การกลั่นแยกสารระดับ โมเลกุล (การกลั่น แบบระยะทางสั้น) ในการแยกสาร พบว่า สิ่งเจือปนในตัวอย่างลดจาก 60.93% เหลือ 6.7% กรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) หายไปในกระบวนการกลั่น แต่กรดโคโคซะเฮกซะอีโนอิก (DHA) เพิ่มขึ้นจาก 0.012% เป็น 0.0135% ในอนาคตอาจจะนำเอทานอลมาใช้ทดแทนเมทานอลในปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อลดความเป็นพิษ นอกจากนั้นปฏิกิริยาไกลเซอโรไลซิสยังเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเปลี่ยน FAME เป็นไตรกลีเซอไรด์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

LE THI THUY TRINH : PRODUCTION AND PURIFICATION OF
OMEGA-3 FATTY ACIDS FROM *Pichia pastoris* USING TRANS-
ESTERIFICATION AND MOLECULAR DISTILLATION TECHNIQUES.
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. APICHAT BOONTAWAN, Ph.D.,
76 PP.

OMEGA-3 FATTY ACIDS/*PICHIA PASTORIS*/FERMENTATION/TRANS-
ESTERIFICATION/MOLECULAR DISTILLATION

The compositions of the medium for recombinant *Pichia pastoris* producing omega-3 fatty acids were determined for maximum biomass production using crude glycerol as a carbon source and ammonium salts as nitrogen sources. The optimization of the medium was done using Box-Behnken, a design software with 3 factors, 3 levels, and 1 response for an optimal level of crude glycerol, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. The optimum composition was 40 g/L crude glycerol, 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and 7 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. This medium was used in a 500L bioreactor with DO 30-40% until day 3 and then reduced DO to 8-10% until day 7. The biomass at day 7 was 4.367 g/L DCW. Using microfiltration and centrifugation, the cells were obtained and drying by spray dry or freeze dry. The freeze dry method was chosen in this study since it gave high quality of dry *P. pastoris* cells. Direct trans-esterification was done with methanol to transfer triglycerides to FAME. The advantages of the direct trans-esterification are high yield up to 70% of FAME can be obtained, no oil extraction step is needed, and oxidation of omega-3 fatty acids can be avoided. Finally, the molecular distillation (short part distillation, SPD) was done. The impurity of the sample before running the SPD was reduced from 60.93% to 6.7 %. The eicosapentaenoic acid (EPA) was lost

after running the SPD, but the docosahexaenoic acid (DHA) increased from 0.012% to 0.0135%. In the future work, ethanol can be used instead of methanol for transesterification that is can be safe for human health. Another way, the glycerolysis can be applied to transfer FAME to triglycerides for human diet.



School of Biotechnology

Academic Year 2020

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____