

以光生化反應器培養微藻生產脂肪酸

王藝蓉、?; 瑞澤; 余世宗

E-mail: 9300026@mail.dyu.edu.tw

摘要

微藻適應環境能力強，且生長分布廣泛，若以微藻生產油脂比利用其他動植物來生產油脂更具優越性，因為他不受時間和空間的限制，能生產人們所需的脂肪酸；與真菌相比，雖然微藻生長速率不如真菌，但由於生長條件比真菌簡單，且不需耗費昂貴的碳水化合物，又不具有魚腥味，故若能以光合作用來培養藻類生產脂肪酸，除具經濟效益外，對人體健康來說，具有預防心臟血管疾病、降低血膽固醇及抗癌等效用。通常動物無法自行快速合成此類多元不飽和脂肪酸，必需直接從飲食中攝取，因此，多元不飽和脂肪酸在人類與動物之醫療及飲食方面甚為重要。本研究以自營性單胞藻 *Tetraselmis chui* 為實驗藻株，取自東港水產試驗所分離保存之藻株，初期是以搖瓶培養，進而擴大至3 L光生化反應器中，進行通氣培養，在固定光照強度(5,000 Lux)與通氣量(3 vvm)的條件下，改變培養溫度(20、25及30)與光照週期(8/16、12/12、16/8及24/0 L/D)，經一次只改變一個因子的方式來進行培養條件的探討，以找出最適培養條件，期望得到最高量之乾菌重、EPA及linolenic acid (次亞麻油酸)產量。實驗結果發現，當培養溫度為25、光照週期為24/0 L/D時，藻體的乾重達到最高量(1.51 g/L)；在EPA含量方面，則在培養溫度為25 與光照週期為12/12 L/D有最高的EPA產量，為3.32 mg/L。而在linolenic acid產量方面，當培養溫度為30、光照週期為16/8 L/D時，linolenic acid產量最高，為16.83 mg/L。

關鍵詞：Tetraselmis chui；光生化反應器；最適培養條件；光照週期；溫度；EPA；linolenic acid

目錄

目錄封面內頁 頁次 簽名頁. 授權書.....	iii	中文摘要.....	iv	英文摘要.....	vi
誌謝.....	viii	目錄.....	ix	圖目錄.....	xiii
表目錄.....	xvii	第一章 緒論.....	1	第二章 文獻回顧.....	3
2.1 微藻.....	3	2.1.1 簡介.....	3	2.1.2 微藻生活史.....	4
2.1.3 微藻培養方式.....	6	2.1.3.1 室內培養和戶外培養.....	6	2.1.3.2 封閉培養和開放培養.....	6
2.1.3.3 無菌培養和非無菌培養.....	9	2.1.3.4 批次、半連續式及連續式培養.....	9	2.2 多元不飽和脂肪酸.....	9
2.2.1 簡介.....	10	2.2.2 多元不飽和脂肪酸之合成路徑.....	10	2.2.3 多元不飽和脂肪酸之重要來源.....	13
2.3 多元不飽和脂肪酸之生理功能.....	15	2.3.1 -次亞麻油酸(GLA).....	15	2.3.2 花生四烯酸(ARA).....	17
2.3.3 二十碳五烯酸(EPA).....	17	2.3.4 二十二碳六烯酸(DHA).....	19	2.4 影響微藻生成多元不飽和脂肪酸之環境因子.....	19
2.4.1 培養基之組成.....	19	2.4.2 添加多元不飽和脂肪酸.....	20	2.4.3 溫度.....	20
2.4.4 pH.....	21	2.4.5 光照強度與週期.....	21	2.4.6 培養時間與藻株年齡.....	22
2.4.7 通氣量.....	22	第三章 材料與方法.....	24	3.1 實驗材料.....	24
3.2 器材.....	24	3.3 實驗方法.....	26	3.3.1 藻株培養與乾燥.....	27
3.3.2 藻體濃度.....	27	3.3.3 脂質萃取.....	27	3.3.4 脂肪酸甲酯之製備.....	28
3.3.5 脂肪酸鑑定方法.....	29	3.3.6 操作因子.....	29	第四章 結果與討論.....	30
4.1 培養時間.....	30	4.1.1 對藻體生長的影響.....	30	4.1.2 脂肪酸組成之分析.....	30
4.2 溫度.....	32	4.2.1 對藻體生長的影響.....	36	4.2.2 脂肪酸組成之分析.....	36
4.3 光照週期.....	45	4.3.1 對藻體生長的影響.....	45	4.3.2 脂肪酸組成之分析.....	50
第五章 結論與未來展望.....	60	5.1 結論.....	60	5.2 未來展望.....	61
參考文獻.....	64	附錄.....	68	圖目錄. 圖2.1 扁藻細胞之分裂週期：(1)成熟動細胞 (2)失去鞭毛呈附著態 (3)細胞分裂 (4)母殼裂開釋出子細胞.....	5
圖2.2 封閉式培養瓶裝置圖 (1)培養容器 (2)通氣管 (3)氣泡石 (4)排氣口 (5)接菌管 (6)培養液輸入管 (7)取樣管.....	8	圖2.3 -3和-6系列多元不飽和脂肪酸之結構.....	12	圖2.4 微生物體內多元不飽和脂肪酸之合成路徑.....	14
圖4.1 Tetraselmis chui 之生長曲線與pH值隨培養時間之變化.....	31	圖4.2 Tetraselmis chui 之生長曲線與其EPA產量隨培養時間之變化.....	34	圖4.3 Tetraselmis chui 之生長曲線與其linolenic acid產量隨培養時間之變化.....	35
圖4.4 當光照週期為8/16 L/D時，溫度對Tetraselmis chui 生長曲線的影響.....	37	圖4.5 當光照週期為12/12 L/D時，溫度對Tetraselmis chui 生長曲線的影響.....	37	圖4.6 當光照週期為16/8 L/D時，溫度對Tetraselmis chui 生長曲線的影響.....	38
圖4.7 當光照週期為24/0 L/D時，溫度					

對Tetraselmis chui 生長曲線的影響.....	38	圖4.8 當光照週期為8/16 L/D時，在不同溫度下培養Tetra- selmis chui，pH值隨時間之變化.....	39
圖4.9 當光照週期為12/12 L/D時，在不同溫度下培養Tetra- selmis chui，pH值隨時間之變化.....	39	圖4.10當光照週期為16/8 L/D時，在不同溫度下培養Tetra- selmis chui，pH值隨時間之變化.....	40
圖4.11當光照週期為24/0 L/D時，在不同溫度下培養Tetra- selmis chui，pH值隨時間之變化.....	40	圖4.12當光照週期為8/16 L/D時，溫度對Tetraselmis chui 之生質量與EPA 產量的影響.....	43
圖4.13當光照週期為12/12 L/D時，溫度對Tetraselmis chui 之生質量與EPA 產量的影響.....	43	圖4.14當光照週期為16/8 L/D時，溫度對Tetraselmis chui 之生質量與EPA 產量的影響.....	44
圖4.15當光照週期為24/0 L/D時，溫度對Tetraselmis chui 之生質量與EPA 產量的影響.....	44	圖4.16當光照週期為8/16 L/D時，不同溫度對Tetraselmis chui之生質量與linolenic acid產量的影響.....	46
圖4.17當光照週期為12/12 L/D時，不同溫度對Tetraselmis chui之生質量與linolenic acid產量的影響.....	46	圖4.18當光照週期為16/8 L/D時，不同溫度對Tetraselmis chui之生質量與linolenic acid產量的影響.....	47
圖4.19當光照週期為24/0 L/D時，不同溫度對Tetraselmis chui之生質量與linolenic acid產量的影響.....	47	圖4.20當培養溫度為20 時，光照週期對Tetraselmis chui 生長曲線之影響.....	48
圖4.21當培養溫度為25 時，光照週期對Tetraselmis chui 生長曲線之影響.....	48	圖4.22當培養溫度為30 時，光照週期對Tetraselmis chui 生長曲線之影響.....	49
圖4.23當培養溫度為20 時，在不同光照週期下培養Tetra- selmis chui，pH值隨時間之變化.....	51	圖4.24當培養溫度為25 時，在不同光照週期下培養Tetra- selmis chui，pH值隨時間之變化.....	51
圖4.25當培養溫度為30 時，在不同光照週期下培養Tetra- selmis chui，pH值隨時間之變化.....	52	圖4.26當培養溫度為20 時，不同光照週期對Tetraselmis chui之生質量與EPA產量的影響.....	55
圖4.27當培養溫度為25 時，不同光照週期對Tetraselmis chui之生質量與EPA產量的影響.....	55	圖4.28當培養溫度為30 時，不同光照週期對Tetraselmis chui之生質量與EPA產量的影響.....	56
圖4.29當培養溫度為20 時，不同光照週期對Tetraselmis chui之生質量與linolenic acid產量的影響.....	58	圖4.30當培養溫度為25 時，不同光照週期對Tetraselmis chui之生質量與linolenic acid產量的影響.....	58
圖4.31當培養溫度為30 時，不同光照週期對Tetraselmis chui之生質量與linolenic acid產量的影響.....	59	表目錄表2.1微藻培養方式的優缺點.....	7
表2.2天然脂肪酸中最常見的不飽和脂肪酸.....	11	表2.3多元不飽和脂肪酸之重要來源.....	16
表2.4生理調節物質之功用.....	18	表3.1 Walne培養基配方.....	25
表4.1 Tetraselmis chui其脂肪酸組成隨培養時間之變化..	33	表4.2 Tetraselmis chui其脂肪酸組成隨培養溫度之變化..	41
表4.3 Tetraselmis chui其脂肪酸組成隨光照週期之變化..	53		

參考文獻

- 吳淑姿 (2002) 海洋單細胞真菌-Schizochytrium sp. S31生產多元不飽和脂肪酸-DHA。台灣大學博士論文，台北。
- 石保金 (1999) 食品生物化學，p. 26-28。中國輕工業出版社，北京。
- 華順、羅玉萍、李思光、鄭敏 (1999) 微生物發酵產油脂的研究進展。中國油脂，24(2):34-37。
- 陳明耀 (1997) 生物餌料培養，p. 43-125。水產出版社，台北。
- 陳啟祥 (1999) 微生物油脂質開發與生產。生物產業 Bioindustry，10 (2):94-104。
- 陳俊興 (1996) 利用海洋微藻生產 -3系列之多元不飽和脂肪酸。大葉大學碩士論文，彰化。
- 陳鋒、姜悅 (1999) 微藻生物技術，p. 214-234。中國輕工業出版社，北京。
- 黃偉勳 (1998) EPA的功能、應用及利用 Shewanella putrefaciens 來生產。食品工業，30(3): 30-37。
- 劉清標 (1999) 海洋微藻 Isochrysis sp. CCMP 1324 超微細結構與多元不飽和脂肪酸之生成。台灣大學博士論文，台北。
- 鄭恆琪、陳佑誠、林良平 (1999) 以鹽度與溫度控制Chlorella minutissima淡水與海水株綠藻之長鏈不飽和脂肪酸產量及成分。中國農業化學會誌，37(3): 319-327。
- 蘇惠美、雷淇祥、廖一久 (1988) 環境因子對三種餌料微藻脂肪酸組成之影響。台灣水產學會會刊，15(1): 21-34。
- 蘇惠美 (1999) 餌料生物之培養與利用，p. 27-31。臺灣省水產試驗所，台北。
- Alonso, D. L. and F. G. Maroto (2000) Plant as “ chemical factories ” for the production polyunsaturated fatty acid, Biotechnol. Adv., 18: 481-497。
- Bajpai, P., P. K. Bajpai and O. P. Ward (1992) Optimization of culture condition for production of eicosapentaenoic acid by Mortierella elongata NRRL 5513, J. Ind. Microbiol.,9:1-18。
- Bajpai, P. and P. K. Bajpai (1993) Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: A review, J. Biotechnology, 30:161-183。
- Brown, C. M. and A. H. Rose (1969) Fatty acid composition of Candida utilis as affected by growth temperature and dissolved oxygen tension, J. Bacteriol., 99: 371-376。
- Brown, M. R., G. A. Dunstan, S. W. Jeffrey, J. K. Volkman, S. M. Barrett, and J. M. Leroi (1993) The influence of irradiance on the biochemical composition of the prymnesiophyte Isochrysis sp. (clone T. Iso), J. Phycol., 29: 601-602。
- Carter, J. P. (1988) Gamma-linolenic acid as a nutrient, Food Technol., 41: 127-134。
- Chetsumon, A., M. Isamu, U. Fusako, Y. Kiyohito, M. Yoshiharu, and M. Tadashi (1994) Antibiotic production by the immobilized cyanobacterium, Scytonema sp. TISTR 8208, in a seaweed-type photobioreactor, J. Appl. Phycol., 6: 539-543。
- Cohen, Z. and Y. M. Heimer (1990) Delta-6 desaturase inhibition. A novel mode of action of norflurazone, Plant Physiol., 93: 347-349。
- Cohen, Z. and S. Cohen (1991) Preparation of eicosapentaenoic acid (EPA) concentrate from Porphyridium creuentum, J. Am. Oil Chem., 68(1): 16-19。
- Cohen, Z., D. Shiran, I. Khozin and Y. M. Heimer (1997) Fatty acid unsaturation in the red alga Phaeodactylum tricorutum , Biochim. Biophys. Acta, 1344: 59-64。
- Connor, W. E., M. Neuringer and S. Reisbick (1992) Essential fatty acid: The importance of n-3 fatty acid in the retina and brain, Nutr. Res., 50(4): 21-29。
- Gellerman, J. L. and K. Schlenk (1979) Methyl directed desaturation of arachidonic acid to eicosapentaenoic acid in the fungus Saprolegnia parasitica, Biochem. Biophys. Acta, 573: 23-30。
- Goodnight, S. H., W. S. Harris, W. E. Conner and D. R. Illingworth (1982) Polyunsaturated fatty acid, hyperlipidemia, and thrombosis,

Arteriosclerosis, 2(2): 87- 113. 26. Grant, W. S. and R. L. Vadas (1976) A Diurnal settling rhythm in *Platymonas subcordiformis* Hazen. The Journal of Protozoology, 557-559. 27. Henderson, R. J., J. W. Leftly and J. R. Sargent (1988) Lipid composition and biosynthesis in aging culture of marine dinoflagellate *Crythecodinium cohnii*, Phytochemistry, 27: 1679-1683. 28. Kinsella, J. E. (1987) Effects of polyunsaturated fatty acid on factors related to cardiovascular disease, American Journal of Cardiology, 60:23-32. 29. Lee, C. G. and B. O. Palsson (1994) High-density algal photobioreactors using light-emitting diodes, Biotechnol. Bioeng., 44: 1161-1167. 30. Matsunaga, T., H. Takeyama, H. Sudo, N. Oyama, S. Arira, H. Takano, M. Hirano, J. G. Burgess, K. Sode and N. Nakamura (1991) Glutamate production from CO₂ by marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. using a novel biosolar reactor employing light-diffusing optical fibers, Appl. Biochem. Biotechnol., 28: 157-167. 31. Miller, A. B. (1980) Nutrition and cancer, Prev. Med, 9: 189- 196. 32. Renaud, S. M., H. C. Zhou, D. L. Parry, L. V. Thinh and K. C. Woo (1995) Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T. Iso), J. Appl. Phycol., 7: 595- 602. 33. Seto, A., H. L. Wong and C. W. Hesseltine (1984) Culture condition affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima*, J. Am. Oil Chem., 61: 892-894. 34. Shimizu, S., H. Kawashima, K. Akimoto and H. Yamada, (1988) Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi, J. Am. Oil Chem., 65: 1445-1459. 35. Shimizu, S., H. Kawashima, K. Akimoto, Y. Shinmen and H. Yamada (1989) Microbial conversion of an oil containing - linolenic acid to an oil containing eicosapentaenoic acid, J. Am. Oil Chem., 66: 342-347. 36. Simopoulos, A. P., R. R. Kifer and A. A. Wykes (1991) w-3 fatty acid: Research advances and support in the field since June 1985, World Rev., 66: 51-71. 37. Sukenik, A., Y. Carmeli, and T. Berner (1989) Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloopsis* sp., J. Phycol., 25: 686-692. 38. Teshima, S. I., Yamasaki, S., Kanazawa, A. and Hirata, H. (1983) Effect of water temperature and salinity on eicosapentaenoic acid level of marine *Chlorella*. Bull., Jap. Soc. Sci. Fish, 49: 805. 39. Walne, P. R. (1974) Culture of Bivalve Molluscs. 50 years ' experience at Conwy, p.173, Fishing News Ltd, England. 40. Weete, J. D. (1980) Lipid Biochemistry of Other Organism, p. 9-48, Plenum Press, New York. 41. Weete, J. D., H. Kim, S. R. Gandhi, Y. Wang and R. Dute (1997) Lipids and ultrastructure of *Thaustochytrium* sp. ATCC 26185, J. Lipids, 32: 830-845. 42. Yongmanitchai, W. and O. P. Ward (1989) Omega-3 fatty acids: alternative sources of production, Process Biochem, 24: 117- 125. 43. Yongmanitchai, W. and O. P. Ward (1991a) Growth and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornum* under different culture condition, Environ Microbiol, 57: 419-426. 44. Yongmanitchai, W. and O. P. Ward (1991b) Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid, Phytochemistry, 30: 2963-2967.