

培養Cunninghamella echinulata和Bacillus cereus DYU-Too 12生產多元不飽和脂肪酸

邱怡翠、吳淑姿

E-mail: 9417966@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究探討Cunninghamella echinulata與Bacillus cereus DYU-Too 12合成多元不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)之最適化條件。先以一次一因子方式(one-factor-at-a-time)進行搖瓶培養，探討不同培養基組成，包括碳源、氮源、碳源濃度、氮源濃度及不同培養條件(溫度和pH值)對Cunninghamella echinulata與Bacillus cereus DYU-Too 12的菌體生長、脂質累積及 α -次亞麻油酸(GLA)和二十碳五烯酸(EPA)合成的影響，並利用實驗設計法進行中心混成之實驗(central composite design, CCD)。經一次一因子實驗後得知，Cunninghamella echinulata搖瓶培養於25、100 rpm及pH 7.0下，以葡萄糖35 g/L和氯化銨1 g/L為基礎培養基之主要營養源組成，可得較佳的生質重7.05 g/L、脂質重1.39 g/L及GLA產量602.48 mg/L；Bacillus cereus DYU-Too 12搖瓶培養於30、100 rpm及pH 7.0下，以葡萄糖20 g/L和氯化銨1 g/L為基礎培養基之主要營養源組成，可得較佳的生質重2.65 g/L、脂質重0.12 g/L及EPA產量35.45 mg/L。實驗為三因子以二水準之中心混成設計，不同濃度氯化銨(0.5、1.0、1.5 g/L)和不同pH值(5、6、7)，在C. echinulata部分以35 g/L葡萄糖為中心點，而Bacillus cereus DYU-Too 12以20 g/L葡萄糖為中心點並配合中心混成設計之補充實驗，計16組處理組合(8組因子試驗、6組星點及2組中心點)，以隨機編排順序進行實驗，經中心混成實驗之結果，以統計軟體STATISTICA進行分析，C. echinulata合成GLA的最適條件為葡萄糖33.82 g/L、氯化銨1.04 g/L及pH 6.02，以最適化條件進行培養，生質量7.45 g/L，而GLA產量為937.32 mg/L，產量達預測值的96%；Bacillus cereus DYU-Too 12合成EPA的最適條件為葡萄糖19.00 g/L、氯化銨0.91 g/L及pH 6.20，以最適化條件進行培養，生質量2.34 g/L，EPA產量為29.47 mg/L，達預測值的96.21%。

關鍵詞：Cunninghamella echinulata；Bacillus cereus DYU-Too 12； α -次亞麻油酸；二十碳五烯酸；中心混成實驗

目錄

目錄封面內頁 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.....	xii
表目錄.....	xv
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
2.1 多元不飽和脂肪酸.....	3
2.1.1 多元不飽和脂肪酸簡介.....	3
2.1.2 多元不飽和脂肪酸之合成途徑.....	6
2.1.3 多元不飽和脂肪酸生理功能及臨床應用.....	9
2.2 α -次亞麻油酸生產菌的研究.....	15
2.3 二十碳五烯酸生產菌的研究.....	19
2.4 影響微生物合成多元不飽和脂肪酸的因子.....	19
2.4.1 培養基的組成.....	19
2.4.2 培養溫度.....	21
2.4.3 起始pH值.....	21
2.4.4 鹽濃度.....	22
2.4.5 培養時間及菌株年齡.....	22
2.5 能合成多元不飽和脂肪酸菌株之篩選.....	24
2.6 實驗設計.....	27
2.6.1 一次一因子探討.....	28
2.6.2 中心混成實驗.....	28
第三章 材料與方法.....	31
3.1 實驗儀器.....	31
3.2 實驗藥品.....	32
3.3 培養基.....	33
3.3.1 菌株活化培養基.....	33
3.3.2 基礎培養基組成.....	33
3.3.3 篩菌培養基組成.....	33
3.4 實驗流程.....	37
3.5 實驗菌株.....	37
3.5.1 Cunninghamella echinulata.....	37
3.5.2 自行篩選菌株.....	40
3.6 菌體顯微鏡觀察.....	42
3.6.1 Cunninghamella echinulata.....	42
3.6.2 Bacillus cereus DYU-Too 12.....	42
3.7 一次一因子條件探討.....	45
3.7.1 碳源.....	46
3.7.2 氮源.....	46
3.7.3 葡萄糖濃度.....	46
3.7.4 氯化銨濃度.....	46
3.7.5 pH值.....	47
3.7.6 溫度.....	47
3.7.7 中心混成實驗設計.....	47
3.8 分析方法.....	50
3.8.1 分析樣品處理流程圖.....	50
3.8.2 生質量之測定.....	50
3.8.3 脂質萃取.....	53
3.8.4 脂肪酸甲酯之製備.....	53
3.8.5 脂肪酸鑑定方法.....	54
3.8.6 碳源測定.....	54
3.8.7 氮源測定.....	56
第四章 材料與方法.....	58
4.1 α -次亞麻油酸之生產.....	58
4.1.1 Cunninghamella echinulata顯微鏡觀	

察.....	58	4.1.2	Cunninghamella echinulata一次一因子 條件探討.....	58	4.1.2.1	碳源.....	61
.....	58	4.1.2.2	氮源.....	61	4.1.2.3	葡萄糖濃度.....	64
4.1.2.4	氯化銨濃度.....	64	4.1.2.5	pH值.....	64	4.1.2.6	溫度.....
.....	67	4.1.3	Cunninghamella echinulata中心混成實 驗設計.....	67	4.1.4		
Cunninghamella echinulata 發酵槽擴大培養..	79	4.2	二十碳五烯酸之生產.....	80	4.2.1	Bacillus cereus	
DYU-Too 12顯微鏡之觀察....	80	4.2.2	菌體脂肪酸分析.....	83	4.2.3	Bacillus cereus DYU-Too 12一次一	
因子 條件探討.....	83	4.2.3.1	碳源.....	83	4.2.3.2	氮源.....	90
.....	87	4.2.3.3	葡萄糖濃度.....	87	4.2.3.4	氯化銨濃度.....	90
pH值.....	90	4.2.3.6	溫度.....	93	4.2.4	Bacillus cereus DYU-Too 12中心	
混成實 驗設計.....	93	第五章	結論與未來展望.....	106	5.1		
結論.....	106	5.2	未來展望.....	107	參考文獻.....		
.....	109	圖目錄	圖2.1 微生物體內多元不飽和脂肪酸之生合成途徑及結構.....	5			
圖2.2 脂質之生合成途徑.....	7	圖2.3	酵母或黴菌於批次培養下生質量與脂肪累積的情形				
.....	23	圖2.4	實驗設計之概念圖(中心混成設計).....	29	圖3.1	實驗流程圖.....	
.....	38	圖3.2	篩菌流程圖.....	41	圖3.3	Neubauer計數器.....	
.....	43	圖3.4	蘇丹黑B染色步驟.....	44	圖3.5	樣品分析流程圖.....	
.....	52	圖3.6	脂肪酸甲酯化流程圖.....	55	圖4.1	位於相差顯微	
鏡下(1,000x)觀察之 Cunninghamella echinulata孢子.....	59	圖4.2	碳源對Cunninghamella echinulata生產				
-次亞麻油酸之影響.....	60	圖4.3	氮源對Cunninghamella echinulata生產				
影響.....	62	圖4.4	葡萄糖濃度對Cunninghamella echinulata生產				
.....	63	圖4.5	氯化銨濃度對Cunninghamella echinulata生產				
.....	65	圖4.6	起始pH值對Cunninghamella echinulata生產				
.....	66	圖4.7	培養溫度對Cunninghamella echinulata生產				
.....	72	圖4.9	發酵槽擴大培養Cunninghamella echinulata生合成				
酸.....	81	圖4.10	光學顯微鏡下觀察之Bacillus cereus DYU-Too 12 內生孢子.....				
.....	82	圖4.11	Bacillus cereus DYU-Too 12位相差顯微鏡圖.....	84	圖4.12	Bacillus	
cereus DYU-Too 脂肪酸甲酯之氣相層析圖.....	85	圖4.13	碳源對Bacillus cereus DYU-Too 12生產EPA的影響.....	86	圖4.14	氮	
源對Bacillus cereus DYU-Too 12生產EPA的影響.....	88	圖4.15	葡萄糖濃度對Bacillus cereus DYU-Too 12 生產EPA的影響.....				
.....	89	圖4.16	氯化銨濃度對Bacillus cereus DYU-Too 12 生產EPA的影響.....				
.....	91	圖4.17	起始pH值對Bacillus cereus DYU-Too 12 生產EPA的影響.....				
92	圖4.18	溫度培養對Bacillus cereus DYU-Too 12 生產EPA的影響.....	94	圖4.19	培養條件		
對EPA產量影響之回應曲面與等高線圖.....	97	表目錄	表2.1 多元不飽和脂肪酸.....	4			
表2.2 生理調節物質之功用.....	14	表2.3	美國人的膳食導引之脂肪酸建議攝取量.....	12	表2.4	微生物生合成	
.....	14	表2.4	微生物生合成				
.....	25	表2.6	DHA的來源.....	26	表3.1	PDA培養基組成.....	
.....	34	表3.2	無機鹽液組成.....	34	表3.3	微量金屬溶液組成.....	
.....	35	表3.4	維生素溶液組成.....	35	表3.5	篩菌培養基組	
成.....	36	表3.6	Cunninghamella echinulata之生物學分類.....	39	表3.7	23因	
子設計控制因子與水準.....	48	表3.8	中心混成設計補充實驗之控因.....	49	表3.9	中心混成實	
表.....	51	表4.1	碳源對生質量、脂質及GLA生成量之影響.....	60	表4.2	氮源對生質量、脂質及GLA生成量之影響.....	63
.....	60	表4.3	葡萄糖濃度對生質量、脂質及GLA生成量之				
影響.....	63	表4.4	氯化銨濃度對生質量、脂質及GLA生成量之影響.....	65	表4.5	起始pH值對生質量、脂質及GLA生成	
量之影響.....	66	表4.6	培養溫度對生質量、脂質及GLA生成量之影響.....	68	表4.7	GLA中心混成設計之實驗與結果	
.....	70	表4.8	Cunninghamella echinulata生質量、脂質及 GLA生成量之中心混成設計.....				
.....	71	表4.9	GLA之正則分析結果.....	74	表4.10	誤差變異數分析表.....	
.....	75	表4.11	純誤差之變異數分析表.....	76	表4.12	中心混成設計GLA生合成量之	
變異數分析.....	77	表4.13	GLA生合成量二階模式之統計迴歸分析結果.....	78	表4.14	碳源對生質量、脂質	
及EPA生成量之影響.....	86	表4.15	氮源對生質量、脂質及EPA生成量之影響.....	88	表4.16	葡萄糖濃度對	
生質量、脂質及EPA生成量之影響.....	89	表4.17	氯化銨濃度對生質量、脂質及EPA生成量之影響.....	91	表4.18	起始pH	
值對生質量、脂質及EPA生成量之影響.....	92	表4.19	培養溫度對生質量、脂質及EPA生成量之影響.....	94	表4.20	EPA中心混成設計之實驗與結果.....	
.....	95	表4.21	Bacillus cereus DYU-Too 12生質量、脂質及 EPA生成量之				
中心混成設計.....	96	表4.22	EPA之正則分析結果.....	100	表4.23	EPA	
誤差變異數分析表.....	101	表4.24	EPA純誤差之變異數分析表.....	102			

參考文獻

- 參考文獻 1. 方文峰。1995。利用 *Mortierella* 屬絲狀真菌生產花生四烯酸之研究。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。台北。 2. 李秀、賴滋漢。1992。食品分析與檢驗。第173-174頁。精華出版社。台北。台灣。 3. 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。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。台北。 4. 林瑩禎、李河水、華傑。2002。機能性油脂在加工食品的應用研究。第22-30頁。財團法人食品工業發展研究所。新竹。台灣。 5. 邱淑媛。2000。利用植物細胞培養及微生物發酵生產多元不飽和脂肪酸之研究。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。台北。 6. 洪哲穎、陳國誠。1992。回應曲面實驗設計法在微生物酵素生產上之應用。化工39 (2):3-18。 7. 段盛秀、楊海明。2002。食品化學實驗修訂版。第20-32頁。藝軒圖書出版社。台北。台灣。 8. 陳俊興。1995。利用海洋微藻生產 ω -3系列之多元不飽和脂肪酸。大葉大學碩士論文。彰化。 9. 陳清泉。1993。最適化實驗設計在食品工業產品開發上的應用。食品工業25 (2):50-62。 10. 陳鴻章、張志嘉。1994。多元不飽和脂肪酸生產菌之篩選。中國農業化學會誌32 (1):33-46。 11. 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。 12. 楊世民、林讚峰。1994。簡介利用回應曲面實驗設計法決定工業微生物的最佳培養基。製酒科技專論彙編 (16):135-150。 13. 蕭鳳岐。1992。DHA提高腦神經機能。食品資訊 (6):19-25。 14. 蘇惠美。1999。飼料生物之培養與利用。台灣省水產試驗所。台北。台灣。 15. Alonso, D. L. and Maroto F. G. 2000. Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Adv.* 18: 481-497. 16. Bajpai, P. Bajpai, P. K. and Ward, O. P. 1991. Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 4304. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68: 509-514. 17. Bajpai, P. K. and Bajpai, P. 1992. Arachidonic acid production by microorganisms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15: 1-10. 18. Barclay, W. R. and Boulder, C. 1992. Process for the heterotrophic production of microbial products with high concentrations of omega-3 highly unsaturated fatty acids. US Patent, 5,130,242. 19. Bowles, R. D. Hunt, A. E. Bremer, G. B. Duchars, M. G. and Eaton, R. A. 1999. Long chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the Thraustochytrids: screening of isolates and optimization of docosahexaenoic acid production. *J. Biotechnol.* 70: 193-202. 20. Carter, J. P. 1988. Gamma-linolenic acid as a nutrient. *Food Technol.* 41(6): 72-82. 21. Carvalho, P. O. Oliveira, J. G. and Pastore, G. M. 1999. Enhancement of gamma-linolenic acid production by the fungus *Mucor* sp LB-54 by growth temperature. *Rev. Microbiol.* 30 (2): 170-176. 22. Certik, M. and Shimizu, S. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* 87 (1): 1-14. 23. Certik, M., Balteszova, L. and Sajbidor, J. 1997. Lipid formation and ω -linolenic acid production by *Mucorales* fungi grown on sunflower oil. *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 101-105. 24. Chen, H. C. and Chang, C. C. 1996. Production of ω -linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Biotechnol. Prog.* 12: 338-341. 25. Cohen, Z. and Cohen, S. 1991. Preparation of eicosapentaenoic acid (EPA) concentrate from *Porphyridium creurentum*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68 (1): 16-19. 26. Conti, E. Stredansky, M. Stredanska, S. and Zanetti, F. 2001. ω -linolenic acid production by solid-state fermentation of *Mucorales* strains on cereals. *Bioresour. Technol.* 76(3): 283-286. 27. Dunstan G. A., Volkman, J. K. Barrett, S. M. and Garland C. D. 1993. Changes in the lipid composition and maximization of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *J. Appl. Phycol.* 5: 71-83. 28. Gema, H., Kavadia, A., Dimou, D. and Tsagou, V. 2002. Production of ω -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 303-307. 29. Goodnight, S. H., Harris, W. S., Conner, W. E. and Illingworth, D. R. 1982. Polyunsaturated fatty acid, hyperlipidemia, and thrombosis. *Arteriosclerosis.* 2 (2): 87-113. 30. Horrobin, D. F. 1987. Low prevalences of coronary heart disease (CHD), psoriasis, asthma and rheumatoid arthritis in Eskimos: are they caused by high dietary intake of eicosapentaenoic acid (EPA), a genetic variation of essential fatty acid (EFA) metabolism or a combination of both? *Med. Hypotheses.* 22 (4): 421-428. 31. Iida, I. Nakahara, T. Yokochi, T. Kamisaka, Y. Yagi, H. Yamaoka, M. and Suzuki, O. 1996. Improvement of docosahexaenoic acid production in a culture of *Thraustochytrium aureum* by medium optimization. *J. Fermentation Bioeng.* 81 (1): 76-78. 32. Jang, H. D. Lin, Y. Y. and Yang, S. S. 2000. Polyunsaturated fatty acid production with *Mortierella alpine* by solid substrate fermentation. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 41: 41-48. 33. Jiang, Y. and Chen, F. 2000. Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*. *Process Biochem.* 35 (10): 1205-1209. 34. Kamlangdee, N. and Fan, K. W. 2003. Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium* sp. isolated from mangrove. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 25 (5): 643-650. 35. Karmali, R. A., Marsh, J. and Fuchs, C. 1984. Effect of omega-3 fatty acid on growth of a rat mammary tumor. *J. Natl. Cancer Inst.* 73 (2): 457-461. 36. Kavadia, A., Komaitis, M., Chevalot, I., Blanchard, F., Marc, I. and Aggelis, G. 2001. Lipid and gamma-linolenic acid accumulation in strains of *Zygomycetes* growing on glucose. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (4): 341-345. 37. Kendrick, A. and Ratledge, C. 1992. Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids.* 27 (1): 15-20. 38. Kinsella, J. E. 1987. Effects of polyunsaturated fatty acid on factors related to cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* 60 (12): 23-32. 39. Krauss, R. M. Eckel, R. H. Howard, B. Appel, L. J. Daniels, S. R. Deckelbaum, R. J. Erdman, J. W. Etherton, P. K. Goldberg, I. J. Kotchen, T. A. Lichtenstein, A. H. Mitch, W. E. Mullis, R. Robinson, K. Rosett, J. W. Jeor, S. S. Suttie, J. Tribble, D. L. and Bazzarre, T. L. 2000. AHA Dietary Guidelines. AHA Scientific Statement, USA. 102 (18):2284-2299. 40. Kristofikova, L. Rosenberg, M. Vlnova, A. Sajbidor, J. and Certik, M. 1991. Selection of *Rhizopus* strains for L(+)-lactic acid and gamma-linolenic acid production. *Folia Microbiol.* 36 (5): 451-455. 41. Ohta, S. Chang, T. Aozasa, O. Ikegami, N. and Miyata, H. 1993. Alterations in fatty acid composition of marine red alga *Porphyridium purpureum* by environmental factors. *Bot. Mar.* 36: 103-107. 42. Patnayak, S. and Sree, A. 2005. Screening of bacterial

associates of marine sponges for single cell oil and PUFA. *Lett. Appl. Microbiol.* 40 (5):358-363. 43. Picciano, M. F. 2001. Nutrient composition of human milk. *Pediatr. Clin. North Am.* 48 (1): 53-67. 44. Ratledge, C. 1994. Yeast, moulds, algae and bacteria as source of lipid, in advances in improved and alternative sources of lipids. Blackie Publishers, London, England, 235-291. 45. Schalin-Karrila, M. Mattila, L. Jansen, C. T. and Uotila, P. 1987. Evening primrose oil in the treatment of atopic eczema: effect on clinical status. Plasma phospholipid fatty acids and circulating blood prostaglandins. *Br. J. Dermatol.* 117 (1): 11-19. 46. Singh, A. and Ward, O. P. 1997. Production of high yields of arachidonic acid in a fed-batch system by *Mortierella alpina* ATCC 32222. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 (1): 1-5. 47. Somashekar, D. Venkateshwaran, G. Sambaiah, K. and Lokesh, B. R. 2002. Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi. *Process. biochem.* 38: 1719-1724. 48. Stinson, E. E. Kwoczak, R. Kurantz, M. 1991. Effect of culture conditions on production of eicosapentaenoic acid by *Pythium irregulare*. *J. Ind. Microbiol.* 8 (3): 171-178. 49. Stredanska, S. and Sajbidor, J. 1992. Oligounsaturated fatty acid production by selected strains of micromycetes. *Folia Microbiol.* 37 (5): 357-359. 50. Uauy-Dagach, R. and Valenzuela, A. 2000. Marine Oils: The health benefits of omega-3 fatty acids. *Nutrition Reviews.* 16 (7-8): 680-684. 51. Vazhappilly, R. and Chen, F. 1998a. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 393-397. 52. Vazhappilly, R. and Chen, F. 1998b. Heterotrophic production potential of omega-3 polyunsaturated fatty acids by microalgae and algae-like microorganisms. *Bot. Mar.* 41: 553-558. 53. Weitzman, I. 1984. The case for *Cunninghamella elegans*, *C. bertholletiae*, and *C. echinulata* as separate species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83:527-528. 54. Wen, Z. Y. and Chen, F. 2000. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25: 218-224. 55. Wen, Z. Y. and Chen, F. 2001. Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 341-347. 56. Xu, X. Q. and Beardall, J. 1997. Effect of salinity on the fatty acid composition of a green microalga from an Antarctic hypersaline lake. *Phytochemistry.* 45: 655-658. 57. Yongmanitchai, W. and Ward, O. P. 1989. Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochem.* 24: 117-125. 58. Yongmanitchai, W. and Ward, O. P. 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 419-425.