

以 *Thraustochytrium* sp. 發酵生產二十二碳六烯酸 = Cultivation of *thraustochytrium* sp. to produce docosahexaenoic acid

張榮權、吳淑姿；余世宗

E-mail: 9708299@mail.dyu.edu.tw

摘要

近幾年來因為社會的進步，大家都開始注重健康，尤其對養生及疾病預防愈來愈重視，而不飽和脂肪酸中的 ω -3 系列，對人體保健有不錯的功效性，如DHA可做為保健食品及醫藥品用途，例如改善腦部機能、預防老年痴呆症、抗血栓，及改善皮膚炎症等。本研究之目的是探討 *Thraustochytrium* sp. 在20L發酵槽培養下，生合成二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)之最適生產條件。發酵實驗進行中，固定 pH和溫度，通氣量及轉速則隨溶氧值之變化加以調整，發酵過程中分析Biomass、Lipid和DHA含量變化，培養時所使用之碳源為葡萄糖(20.0 g/L)；氮源則使用硫酸銨(1.0 g/L)；pH值控制在pH 6.5；培養溫度為25℃；起始通氣量0.375 v.v.m；起始轉速100 rpm。由實驗結果顯示，當培養至30 hrs，氮源完全消耗，碳源則仍有11.54 g/L，生質量和脂質合成持續增加，並於培養33 hrs後生質量和脂質合成累積量開始大量增加，直至葡萄糖被消耗完後，生質量和脂質合成累積量才下降。在無碳源的情況下，脂質量逐漸降低，此乃微生物利用自身合成的脂質。當培養至37 hrs時，菌體的生質量最高達到3.48 g/L、脂質合成累積量最高達1.58 g/L，且菌株之生長和脂質合成累積量已趨近於平衡。此時，二十二碳六烯酸產量達251.07 mg/L。脂質合成累積量和二十二碳六烯酸產量分別佔生質量的48及7.61 % (w/w)。關鍵字： *Thraustochytrium* sp.、二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)

關鍵詞： *Thraustochytrium* sp.；二十二碳六烯酸

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	vii	目錄	viii	圖目錄	xi	表目錄	xii	1. 緒言	1	2. 文獻回顧	3	2.1 脂肪酸	3	2.2 多元不飽和脂肪酸(PUFAs)	3	2.2.1 何謂多元不飽和脂肪酸	3	2.2.2 PUFAs的生理功能	5	2.2.3 PUFAs之生物合成途徑	7	2.2.4 DHA的生理作用	9	2.2.5 PUFAs之應用	13	2.3 ω -3係多元不飽和脂肪酸之市場需求及生產方式	13	2.3.1 ω -3係PUFAs之市場需求	13	2.3.2 ω -3係PUFAs之生產方式	16	3. 材料與方法	20	3.1 實驗材料	20	3.1.1 菌株	20	3.1.2 藥品	20	3.1.3 儀器設備	21	3.2 菌株培養	24	3.2.1 平板培養	24	3.2.2 種培養	24	3.2.3 預培養	27	3.2.4 20L批次發酵培養	27	3.3 分析方法	29	3.3.1 分析樣品處理流程圖	29	3.3.2 生質量之測定	29	3.3.3 脂質萃取	29	3.3.4 脂肪酸甲酯之製備	31	3.3.5 脂肪酸鑑定方法	31	3.3.6 碳源測定	32	3.3.7 氮源測定	33	4. 結果與討論	35	4.1 <i>Thraustochytrium</i> sp.菌相	35	4.2 培養基中碳和氮可利用量對生質量、脂質累積和DHA生成量之影響	35	4.3 溶氧量對生質量、脂質和DHA生成量之影響	41	4.4 批次發酵之菌體生產速率	47	4.5 批次發酵之脂質生產速率	51	4.6 每克葡萄糖轉化為脂質的量	55	4.7 DHA產量	55	5. 結論	58	5.1 結論	58	5.2 未來展望	58	參考文獻	59	附錄	62	圖目錄	圖2.1 脂肪酸的分類	4	圖2.2 典型PUFAs之分子結構式	6	圖2.3 PUFAs之生物合成途徑	8	圖3.1 實驗架構圖	22	圖3.2 樣品分析流程圖	30	圖4.1 發酵槽培養 <i>Thraustochytrium</i> sp.生產DHA	38	圖4.2 <i>Thraustochytrium</i> sp.搖瓶培養	39	圖4.3 光學顯微鏡下觀察 <i>Thraustochytrium</i> sp.	40	圖4.4 轉速及通氣量對生質量之變化	42	圖4.5 溶氧量對生質量之變化	43	圖4.6 殘碳、氮量對生質量之變化	44	圖4.7 殘碳、氮量對脂質及DHA之變化	45	圖4.8 溶氧量對脂質及DHA之變化	46	圖4.9 培養時間對生質量之平均生產速率之變化	49	圖4.10 培養時間對生質量之平均比生長速率之變化	50	圖4.11 培養時間對脂質之平均生產速率之變化	53	圖4.12 培養時間對脂質之平均比生產速率之變化	54	圖4.13 殘碳量對脂質轉化率之變化	57	表目錄	表2.1 含PUFAs之脂質的商品在生物醫學及藥物食品上的應用	14	表2.2 市場上多元不飽和脂肪酸的商品	15	表2.3 多元不飽和脂肪酸之來源	17	表2.4 DHA的來源	18	表3.1 <i>Thraustochytrium</i> sp.的生物學分類	20	表3.2 無機鹽類之組成	25	表3.3 微量金屬溶液之組成	26	表4.1 培養時數對生質量、脂質及DHA生成之影響	36	表4.2 培養時數之殘糖、殘氮量對生質量和脂質累積影響	37	表4.3 培養時間對生質量之平均生產速率之變化	48	表4.4 培養時間對脂質之平均生產速率之變化	52	表4.5 碳量對脂質轉化率之變化	56
------	-----	-----	-----	------	----	------	----	----	-----	----	------	-----	----	-----	-----	-------	---	---------	---	---------	---	---------------------	---	------------------	---	------------------	---	--------------------	---	----------------	---	----------------	----	------------------------------------	----	------------------------------	----	------------------------------	----	----------	----	----------	----	----------	----	----------	----	------------	----	----------	----	------------	----	-----------	----	-----------	----	-----------------	----	----------	----	-----------------	----	--------------	----	------------	----	----------------	----	---------------	----	------------	----	------------	----	----------	----	-----------------------------------	----	------------------------------------	----	--------------------------	----	-----------------	----	-----------------	----	------------------	----	-----------	----	-------	----	--------	----	----------	----	------	----	----	----	-----	-------------	---	--------------------	---	-------------------	---	------------	----	--------------	----	---	----	--------------------------------------	----	---	----	--------------------	----	-----------------	----	-------------------	----	----------------------	----	--------------------	----	-------------------------	----	---------------------------	----	-------------------------	----	--------------------------	----	--------------------	----	-----	---------------------------------	----	---------------------	----	------------------	----	-------------	----	--	----	--------------	----	----------------	----	---------------------------	----	-----------------------------	----	-------------------------	----	------------------------	----	------------------	----

參考文獻

- 1.王中奇。1996。魚油中多元不飽和脂肪酸在人體內的代謝及生理機能。食品工業月刊10:8-15。
- 2.王致誠。1997。DHA生理保健新發現。藥物與人10(6):32-33。
- 3.王萍。1998。DHA可造就天才。國外科技動態6:47。
- 4.王萍。1998。DHA可治癒阿茲海默氏病。國外科技動態6:48。
- 5.江孟榮、張淑美。1995。膳食魚油大白鼠的血漿脂蛋白及血漿濃度之影響。中華營養會志20:201-214。
- 6.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。
- 7.吳平、應如冰。1995。DHA、EPA在乳制品中的應用。中國乳品工業23(6):280-282。
- 8.吳葆杰。1997。各種脂肪酸與冠心病猝死關係的研究進展。中國生化藥物學志18(6):317-320。
- 9.范文洵。1988。 ω -亞麻酸及其代謝產物EPA和DHA。生理科學進展19(2):110-113。
- 10.祝向紅。1986。

二十碳五烯酸的抗缺血性疾病作用。生理科學進展17(2):166-168。 11.洪濱、劉會洲。1996。國內EPA及DHA研究現狀和發展趨勢。化工冶金17(1):80-85。 12.翁鵬傑、彭俊明、陳玉燕、許碧蘭、黃東裕、盧虹佑。2000。哈伯氏生物化學(冊)。第 277-286頁。藝軒圖書出版社。台北。台灣。 13.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。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。台北。 14.劉兆平。1984。二十碳五烯酸代謝和生理作用。海洋藥物12(4):9-14。 15.Alonso, D. L. and Maroto, F. G. 2000. Plant as chemical factories for the production polyunsaturated fatty acid. *Biotechnol. Adv.*18, 481-497. 16.Bajpai, K. and Bajpai, P. K. 1993. Eicosapentaenoic acid(EPA)production from microorganisms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30,161-183. 17.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, 5130242. 18.Barclay, W. R., Meager, K. M. and Abril, J. R. 1994.Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *J. Appl. Phycol.*6, 123-129. 19.Belarbi, E. H., Molina, E. and Chisti, Y. 2000. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme Microbiol. Technol.* 26, 516-529. 20.Bimbo, A. P. 1987. The imerging marine oil industry. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*64,706-715. 21.Dyerberg, J. 1986. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutri. Rev.* 44, 125-134. 22.Gill, I. and Valivety, R. 1997. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol.* 15, 401-409. 23.Granger, L. M., Perlot, P., Goma, G. and Pareilleux, A. 1993. Effect of varios nutrient limitations on fatty acid production by *Rhodotorula glutinis*. *App. Micr obiol Biotechnol.* 38, 784-789. 24.Horrobin, D. F. 1981. Loss of delta-6-desaturase as a key factor in aging, *Med. hypothesis*, Vol. 7, pp. 1211-1220. 25.Jareokitmongkol, S., Sakuradani, E. and Shimizu, S. 1993. A novel 5-desaturase-defective mutant of *Mortierella alpine* 1S-4 and its dihomolinoleic acid production. *App. Environ. Microbiol.* 59, 4300-4304. 26.Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D. and Binkoski, A. E. 2004. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health. *Nutr: Rev.* 62: 414-426. 27.Leaf, A., Kang, J. X., Xiao, Y. F. and Billman, G. E. 1999. n-3 fatty acids in the prevention of cardiac arrhythmias, *Lipids*, Vol. 34, pp. S187-S189. 28.Sardesai, V. S. 1992. Nutritional role of polyunsaturated fatty acids, *J. Nutr. biochem*, Vol.3, pp. 154-166. 29.Sayanova, O., Smith, M. A., Lapinskas, P., Stobart, A. K., Dobson, G., Christie, W. W.,Shewry, P. R. and Napier, A. J. 1997. Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of 6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 4211-4216. 30.Shirasala, N. and Shimizu, S. 1995. Production of eicosapentaenoic acid by *Saprolegnia* sp. 28YTF-1. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 72, 1545-1549. 31.Singh, A., and Ward, O. P. 1997. Microbial production of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6). *Adv. App. Microbial.* 45, 271- 312. 32.Yamauchi, H., Mori, H., Kobayashi, T. and Shimizu, S. 1983. Mass production of lipids by *lipomyces starkeyi* in microcomputer-aids fedbatch culture. *J. Ferment. Technol.* 61, 275-280. 33.Yongmanitchai, W. and Ward, O.P.1989. Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochem.* 21, 117-125.