

以回應曲面法探討 *Thraustochytrium* sp. 對脂質生成之影響 = Use response surface methodology to study lipid production by..

張志成、吳淑姿；余世宗

E-mail: 9708304@mail.dyu.edu.tw

摘要

二十二碳六烯酸為人體無法自行合成的多元不飽和脂肪酸須由飲食中去攝取，具有降低血清三酸甘油濃度、降血壓、抗發炎等功能，*Thraustochytrium* sp. 可用以生產二十二碳六烯酸，本研究以回應曲面法探討 *Thraustochytrium* sp. 菌的生長，並建立其數學模式，先以一次一因子進行搖瓶培養，探討不同培養基組成，包括碳源、氮源、碳源濃度、氮源濃度、不同培養條件溫度及培養基起始pH值對 *Thraustochytrium* sp. 菌的生長及脂質生成的影響，並利用實驗設計法進行中心混成之實驗。經一次一因子實驗得知，*Thraustochytrium* sp. 搖瓶培養於25 °C及pH 6.0下，以葡萄糖40 g/L、氯化銨1.0 g/L為基礎培養基是比較合適操作條件及主要營養組成，以一次一因子實驗結果為基礎，實驗以三因子以二水準之中心混成設計，不同氯化銨濃度(0.5、1.0、1.5 g/L)和不同pH(5、6、7)以40 g/L葡萄糖為中心點並配合中心混成設計之補充實驗，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，中心混成之實驗結果，以統計軟體STATISTICA進行分析，*Thraustochytrium* sp. 脂質生成的最適條件為葡萄糖40.52 g/L、氯化銨1.07 g/L及pH 6.19，以最適條件進行培養，脂質生成量為227.69 mg/L，可達預測值95%，而其檢定係數為0.9261。將實驗設計所得到之最適化的結果，在5 L的發酵槽中進行 *Thraustochytrium* sp. 菌的培養。在25 °C下培養99 hr，其生質量為2.3 g/L，此產量為搖瓶培養最佳化條件培養之2.7倍，脂質生成量為943 mg/L，此產量為搖瓶培養最佳化條件培養之4.5倍。

關鍵詞： *Thraustochytrium* sp.、一次一因子、中心混成實驗、發酵槽

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xiii
1. 緒論1
2. 文獻回顧3
2.1 脂肪酸簡介3
2.1.1 生產多元不飽和脂肪酸之微生物4
2.1.2 多元不飽和脂肪酸之生成途徑7
2.1.3 多元不飽和脂肪酸的生理功能7
2.2 實驗設計10
2.2.1 一次一因子法10
2.2.2 回應曲面法12
2.3 影響微生物生成脂質的因子14
2.3.1 碳源14
2.3.2 氮源14
2.3.3 碳氮比15
2.3.4 無機鹽類15
2.3.5 pH15
2.3.6 溫度16
2.3.7 通氣量16
2.3.8 培養時間及菌株年齡16
2.4 培養基組成對脂肪酸生成影響16
3. 材料與方法19
3.1 實驗材料19
3.1.1 實驗儀器19
3.1.2 實驗藥品20
3.1.3 實驗菌株20
3.2 培養基20
3.2.1 <i>Thraustochytrium</i> sp. 活化培養基22
3.2.2 基礎培養基22
3.3 菌株斜面培養及保存22
3.4 顯微鏡觀察22
3.5 實驗架構25
3.6 一次一因子探討 <i>Thraustochytrium</i> sp. 菌體的生長25
3.6.1 不同碳源種類探討25
3.6.2 不同氮源種類探討27
3.6.3 不同葡萄糖濃度探討27
3.6.4 不同氯化銨濃度探討27
3.6.5 不同起始pH值探討27
3.6.6 不同培養溫度探討28
3.6.7 中心混成設計28
3.6.8 發酵槽培養28
3.5 分析方法32
3.5.1 分析樣品處理流程圖32
3.5.2 生質量之測定32
3.5.3 脂質萃取32
4. 結果與討論34
4.1 <i>Thraustochytrium</i> sp. 顯微鏡觀察34
4.2 <i>Thraustochytrium</i> sp. 一次一因子條件探討34
4.2.1 不同碳源的影響探討34
4.2.2 不同氮源的影響探討34
4.2.3 不同葡萄糖濃度之影響探討37
4.2.4 不同氯化銨濃度探討37
4.2.5 不同起始pH值的影響探討37
4.2.6 不同培養溫度的影響探討39
4.3 <i>Thraustochytrium</i> sp. 中心混成實驗設計39
4.4 正則分析53
4.5 因子影響效應之分析53
4.6 發酵槽培養56
5. 結論60
5.1 結論60
5.2 未來展望60
參考文獻62
圖目錄 圖2.1 生物體內多元不飽和脂肪酸之合成途徑5 圖2.2 典型PUFAs之分子結構式6 圖2.3 多元不飽和脂肪酸之生成途徑9 圖2.4 實驗設計之概念圖13 圖2.5 酵母菌或黴菌於批次培養下生物質量與脂肪酸累積的情形18 圖3.1 實驗架構圖26 圖3.2 樣品分析流程圖33 圖4.1 光學顯微鏡下觀察之 <i>Thraustochytrium</i> sp. (400 X)35 圖4.2 葡萄糖濃度和氯化銨濃度對脂質產量影響之回應曲面與等高線圖44 圖4.3 葡萄糖濃度和起始pH值對脂質產量影響之回應曲面與等高線圖45 圖4.4 氯化銨濃度和起始pH值對脂質產量影響之回應曲面與等高線圖46 圖4.5 各試驗因子主效應及因子間交互作用之柏拉圖47 圖4.6 殘差與預測值之散佈圖48 圖4.7 中心混成實驗之測量值與預測值49 圖4.8 發酵槽批次培養其pH值、鹼量和溶氧量之變化58 圖4.9 發酵槽批次培養其生質量及脂質生成量之變化59 表目錄 表2.1 多元不飽和脂肪酸之來源8 表2.2 -6/-3多元不飽和脂肪酸比例建議值11 表3.1 <i>Thraustochytrium</i> sp. 的生物學分類21 表3.2 PDA培養基組成23 表3.3 無機鹽類之組成23 表3.4 微量金屬溶液之組成24 表3.5 23因子設計之控制因子與水準29 表3.6 中心混成設計之補充實驗之控因30 表3.7 中心混成實驗設計表31 表4.1 於不同碳源對生物質量及脂質生成量之影響36 表4.2 不同氮源對生物質量及脂質生成量之影響36 表4.3 葡萄糖濃度對生物質量及脂質生成量之影響38 表4.4 氯化銨濃度對生物質量及脂質生成量之影響38 表4.5 不同起始pH值對生物質量及脂質生成量之影響40 表4.6 不同培養溫度對生物質量及脂質生成量之影響40 表4.7 脂質生成中心混成設計之實驗與結果42 表4.8 <i>Thraustochytrium</i> sp. 生物質量及脂質中心混成設計之實驗結果43 表4.9 脂質生成誤差變異分析表50 表4.10 脂質生成純誤差變異分析表51 表4.11 中心混成脂質生成變異數分析52 表4.12 脂質生成之正則分析結果54 表4.13 脂質生成量二階模式之統計迴歸分析結果55

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. 林嘉銘。2007。-6/-3 脂肪酸比例與心血管疾病之關係。食品工業第39卷第10期:10-13
3. 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。
4. 張洪濤、單雷、畢玉平。2006。n-3和n-6不飽和脂肪酸在人和動物體內的功能關係。山東農業科學。2:115-120。
5. 劉清標。1999。海洋微藻 *Isochrysis* sp. CCMP 1324 超微細結構與不飽和脂肪酸之生成。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。台北。
6. Ahn, T. H., Y. P. Lee and J. S. Rhee. 1997. Investigation of refolding condition for *Pseudomonas fluorescences* lipase by response surface methodology. *J. Biotech.* 54, 151-160.
7. Brown, C. M. and Rose, A. H. 1969. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254.
8. Carvalho, P. O. Oliveira, J. G. and Pastore, G. M. 1999. Enhancement of gammalinolenic acid production by the fungus *Mucor* sp LB-54 by growth temperature. *Rev. Microbiol.* 30 (2): 170-176.
9. Certik, M. and Shimizu, S. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial Polyunsaturated fatty acid production. *J. Bioeng.* 87:1-14.
10. Chen, H. C. 1996. Optimizing the concentrations of carbon, nitrogen and phosphorus in a citric acid fermentation with response surface method. *Food Biotechnol.* 10, 13-27.
11. Gellerman, J. L. and Schlenk, K. 1979. Methyl directed desaturation of arachidonic acid to eicosapentaenoic acid in the fungus *Saprolegnia parasitica*. *Biochem. Biophys. Acta* 573: 23-30.
12. 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.
13. Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S. and Apple, L. J. 2002. Fish consumption fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation.* 106:2747-2457
14. 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.
15. 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.
16. Silva, F. L. H., M. I. Rodrigues and F. Maugeri. 1999. Dynamic modeling, simulation and optimization of an extractive continuous alcoholic fermentation process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74, 176-182.
17. 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.
18. Sugano, M. and Hiranara, F. 2000. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Japan. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(supple):189-196.
19. Tapiero, H., Ba, G. N., Couvreur, P. and Tew, K. D. 2002. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed. Pharmacother.* 56:215-222.
20. Yongmanitchai, W. and Ward, O. P. 1989. Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochem.* 24: 117-125.
21. Yamauchi, H., H. Mori, T. Kobayashi and S. Shimizu. 1983. Mass production of lipids by *lipomyces starkeyi* in microcomputer-aids fedbatch culture. *J. Ferment. Technol.* 61, 275-280.