

私立東海大學化學工程暨材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏宏偉博士

Advisor : Hong-Wei Yen, Ph.D.

在 *Mortierella isabellina* 發酵過程中提升 γ -亞麻酸之發酵策略研究

The enhancement of gamma linolenic acid (GLA) production

during the fermentation of *Mortierella isabellina*

研究生：蔡景綸 撰

Graduate student : Ching-Lun Tsai

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

中文摘要

Mortierella isabellina (BCRC31721) 是一株高產油脂之黴菌，生物油脂中含有多種不飽和脂肪酸。且 *M. isabellina* 細胞生長快速、可進行高密度細胞培養，具有相當高的發展潛力。

γ -亞麻酸 (GLA) 是一種人體必需的多元不飽和脂肪酸，在結構上屬於特殊的 Omega-6 系列脂肪酸。為人體不能自行製造、必須從食物中攝取的物質。最初 γ -亞麻酸主要來源於植物種子油，例如月見草、黑醋栗、琉璃苣草等的種子油，而 γ -亞麻酸亦可利用微生物發酵方法大量生產，本實驗研究於 *M. isabellina* 發酵過程中改變發酵策略，使菌體中的 γ -亞麻酸累積量提高。

液態搖瓶發酵實驗中，添加界面活性劑 tweem80 後菌體濃度上升， γ -亞麻酸累積量亦會增加，但 γ -亞麻酸之單位菌體產量不會隨 tweem80 添加濃度而改變。液態搖瓶發酵中添加不同濃度之植物油後對菌體濃度提升有顯著效果，但對 γ -亞麻酸累積量無太大影響。在額外添加不同比例之 Hexadecanol 的搖瓶實驗中，當添加濃度為 2 % 時，菌體濃度可達 28.8 g/L， γ -亞麻酸產率為 34.2 mg/L； γ -亞麻酸之單位菌體產量為 1.26 mg/g。若以 Hexadecanol 取代葡萄糖作為碳源使用，添加濃度為 2% 時，菌體濃度為 12.5 g/L， γ -亞麻酸產率為 45.2 mg/L； γ -亞麻酸之單位菌體產量為 3.49 mg/g。當放大至 5L 氣舉式發酵槽中進行培養，並額外添加 Hexadecanol 濃度為 2 % 時，菌體濃度為 7.48 g/L， γ -亞麻酸產率為 85.7 mg/L； γ -亞麻酸之單位菌體產量為 4.10 mg/g。若以 Hexadecanol 取代葡萄糖作為碳源使用，添加濃度為 2%，並放大至 5L 氣舉式發酵槽培養，當培養至 72 hr 時 γ -亞麻酸累積量達到最高 195.2 mg/L，為控制組的 3.6 倍；而 GLA/Biomass 亦於 72 hr 時達到最高 21.2 mg/g，為控制組的 2 倍。添加 Hexadecanol 雖無法提高菌

體濃度，但菌體可將 Hexadecanol 轉換代謝為脂肪酸，並增加 γ -亞麻酸之累積量。於液態發酵實驗中建立兩階段式變溫策略，培養至 120 hr 時將溫度降為 8°C 進行第二階段培養，得知後期低溫培養有利於 γ -亞麻酸累積，可以有效提升 γ -亞麻酸之單位菌體產量。

關鍵字：*M. isabellina*、 γ -亞麻酸(GLA)、Hexadecanol、兩階段式變溫

Abstract

Mortierella isabellina (BCRC31721) is a fungus that can accumulate copious quantities of lipid. And the lipid contains many kinds of unsaturated fatty acids. *M. isabellina* grows fast. Therefore, it has a very high potential for development.

γ -Linolenic acid (GLA) is an polyunsaturated fatty acid which is indispensable for human beings, and categorized as an n-6 (also called ω -6 or omega-6) fatty acid. The body cannot manufacture its own, thus must be obtained from foods such as vegetable oils like evening primrose, black currant, and borage grass. And γ -linolenic acid can also be mass-produced by microbial fermentation. This experiment is to add cetyl alcohol (Hexadecanol) during the fermentation of *M. isabellina*, induced the accumulation of γ -linolenic acid in the cells.

After adding the surfactant tween80 in the liquid shake flask fermentation, the biomass was increased, and γ -linolenic acid accumulation was also increased. But the unit yield of γ -linolenic acid did not change with the concentration of tween80. After adding different concentrations of vegetable oil, the biomass increase had a significant effect. But the γ -linolenic acid accumulation did not have much effect. In a shake flask experiment with adding different proportions of cetyl alcohol. When adding a concentration of 2%, biomass could reach 28 g/L. The yield of γ -linolenic acid was 34.2 mg/L, and GLA/Biomass was 1.26 mg/g. In a shake flask experiment with replace glucose with cetyl alcohol. Add a concentration of 2% cetyl alcohol, biomass was 12.5 g/L, the yield of γ -linolenic acid was 45.2 mg/L, and GLA/Biomass was 3.49 mg/g. In the 5 L airlift tank experiment, adding a concentration of 2% cetyl

alcohol, biomass was 7.48 g/L. the yield of γ -linolenic acid could reach a maximum of 85.7 mg/L, and GLA/Biomass was 4.10 mg/g. In the 5 L Airlift experiment with replace glucose with cetyl alcohol, γ -linolenic acid reached a maximum of 195.2 mg/L when incubated to 72 hr. The accumulation is 3.6 times the control group. And GLA/Biomass also reached a maximum of 21.2 mg/g when incubated to 72 hr. GLA/Biomass is 2 times the control group. Although adding cetyl alcohol could not increase the biomass, *M. isabellina* could metabolize cetyl alcohol as fatty acids, and increased the accumulation of γ -linolenic acid. If the establishment of two-stage temperature fermentation in liquid fermentation, the temperature was reduced to 8°C for the second stage after incubation for 120 hr. Low temperature culture was favorable for γ -linolenic acid accumulation. And also could effectively enhance the unit yield of γ -linolenic acid.

Keywords: *Mortierella isabellina*, γ -linolenic acid (GLA), Hexadecanol, Two-stage temperature change

誌謝

研究所這段時間遇到很多不同的事情，感謝這一路受到很多人的幫助和照顧，首先要非常感謝指導教授 顏宏偉老師，在這長達兩年的過程中，一路從大學生到研究生的角色轉換中給了非常多的建議以及教誨，使我在求學的路上即使艱辛也受益匪淺，老師的鼓勵也轉換成了人生前進的動力，推著我往人生下一個階段繼續邁進，在此謹致上由衷的謝意。同時感謝南台科大生科所 陳柏庭教授、中國醫藥大學醫研部 張瑞仁博士，於口試期間給予寶貴的建議，在此致上最誠摯的謝意。

在研究所的求學過程中，感謝學長姐于婷、Pinpin、旻玉、車車、國智、老翰、子翔、裕仁、小喵、星哥的指導與照顧，也感謝同學淵淵、惟翔、晉安、猩猩、蕭蕭、威仁、俊嘉、賴榮的互相鼓勵與照顧，以及感謝學弟妹哲嘉、禮凡、春傑、竣洧、戰鬥陀螺又誠、斑馬子容、趙庭庭、任任、悠軫等，在我求學過程中增加許多歡笑，有許多不同的回憶，增添了研究過程中的樂趣。另外感謝過程中幫助我的陳正麒先生、系辦學姐們、以及系上老師，你們的幫助使得求學過程更加豐富與順利。最後，謹將此論文獻給我的父母以及家人，感謝他們的付出以及在精神上的支持與鼓勵，才可以讓我順利的完成研究，謝謝你們。

目錄

中文摘要	I
Abstract.....	III
誌謝	V
目錄	VI
圖目錄	XII
表目錄	XV
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2.1 脂肪酸.....	2
2.1.1 γ -亞麻酸.....	3
2.2 產油微生物.....	4
2.2.1 微生物油脂.....	6
2.3 微生物產油機制.....	8
2.4 影響微生物油脂產量因子.....	12
2.4.1 溫度.....	12
2.4.2 pH 值.....	12

2.4.3	碳源和氮源.....	12
2.4.4	碳源.....	13
2.4.5	氮源.....	13
2.4.6	無機鹽和微量元素.....	13
2.5	發酵法生產 γ -亞麻酸之影響因子.....	14
2.5.1	碳氮源.....	14
2.5.2	金屬離子.....	14
2.5.3	菌體型態.....	15
2.5.4	溫度.....	15
2.6	固態發酵培養之影響因子.....	17
2.6.1	水分含量、濕度(moisture).....	17
2.6.2	溫度 (Temperature).....	18
2.6.3	pH 值.....	18
2.6.4	顆粒大小.....	18
2.7	被孢黴 (<i>Mortierella</i>).....	19
2.7.1	菌種選擇- <i>Mortierella isabellina</i>	19
2.8	幫助溶氧物質 (Oxygen-vector).....	20
2.8.1	界面活性劑 Tween80.....	20

2.9	化學誘變劑 NTG	21
2.10	植物油	22
2.11	Hexadecanol	23
2.12	發酵策略	24
2.12.1	液態批次微生物發酵	24
2.12.2	固態微生物發酵	24
2.12.3	固態發酵與液態發酵之差異	25
第三章	材料與方法	26
3.1	實驗材料	26
3.1.1	菌株	26
3.1.2	實驗藥品	27
3.2	實驗儀器	29
3.3	分析方法	31
3.3.1	菌體濃度分析方法	31
3.3.2	γ -亞麻酸濃度分析方法	31
3.4	實驗方法	32
3.4.1	原始菌種保存	32
3.4.2	培養基組成	32

3.4.2.1	種子培養基 (Seed culture medium, SM)	32
3.4.2.2	發酵培養基 (Fermentation medium, FM)	33
3.4.3	接菌	34
3.5	實驗架構	35
3.6	實驗培養條件	36
3.6.1	細胞突變發酵程序	36
3.6.1.1	以 NTG 進行細胞突變	36
3.6.1.2	菌體培養時間之影響	36
3.6.2	固態搖瓶批次發酵程序	37
3.6.2.1	不同含水量之影響	37
3.6.2.2	基質切塊之影響	37
3.6.3	液態搖瓶批次發酵程序	38
3.6.3.1	添加 tween80 之影響	38
3.6.3.2	添加植物油之影響	38
3.6.3.3	添加 Hexadecanol 之影響	40
3.6.3.4	兩階段溫度變化之影響	41
3.6.4	5 L 發酵槽批次發酵程序	41
3.6.4.1	攪拌式發酵槽與氣舉式發酵槽之比較	41

3.6.4.2	改變通氣量之影響	42
3.6.4.3	添加 Hexadecanol 之影響	42
3.6.4.4	兩階段溫度變化之影響	44
3.7	實驗裝置圖	45
3.7.1	液態搖瓶發酵培養裝置圖	45
3.7.2	固態搖瓶發酵培養裝置圖	45
3.7.3	5 L 攪拌式發酵培養裝置圖	46
3.7.4	5 L 氣舉式批次發酵培養裝置圖	47
第四章	結果與討論	48
4.1	細胞突變發酵程序	48
4.1.1	以 NTG 進行細胞突變	48
4.1.2	菌體培養時間之影響	51
4.2	固態搖瓶批次發酵程序	53
4.2.1	不同含水量之影響	53
4.2.2	基質切塊之影響	55
4.3	液態搖瓶批次發酵程序	57
4.3.1	添加 tween8 之影響	57
4.3.2	添加植物油之影響	59

4.3.3	添加 Hexadecanol 之影響.....	66
4.3.4	兩階段溫度變化之影響.....	70
4.4	5 L 發酵槽批次發酵程序.....	72
4.4.1	攪拌式發酵槽與氣舉式發酵槽之比較.....	72
4.4.2	改變通氣量之影響.....	77
4.4.3	添加 Hexdecanol 之影響.....	80
4.4.3.1	額外添加 Hexadecanol 影響之綜合探討.....	83
4.4.3.2	以 Hexadecanol 取代 Glucose 之綜合探討.....	86
4.4.4	兩階段溫度變化之影響.....	89
第五章	結論與未來展望.....	94
5.1	結論.....	94
5.2	未來展望.....	96
	參考文獻.....	97
	附錄.....	102
	作者簡歷.....	103

圖目錄

圖 2-1	γ -亞麻酸結構.....	3
圖 2-2	檸檬酸循環代謝圖 (Ratledge C. et al., 2004).....	9
圖 2-3	脂肪酸累積代謝圖 (Ratledge C. et al., 2004).....	10
圖 2-4	The fatty acid and TAG biosynthesis pathway in microorganisms (Liang et al., 2013).....	11
圖 2-5	微生物多元不飽和脂肪酸的代謝路徑 (Ratledge C. et al., 2004).....	16
圖 3-1	<i>Mortierella isabellina</i> 在 agar plate 上之外觀.....	26
圖 3-2	<i>M. isabellina</i> 之液態搖瓶實驗裝置圖.....	45
圖 3-3	<i>M. isabellina</i> 之固態搖瓶實驗裝置圖.....	45
圖 3-4	5 L 攪拌式發酵槽裝置圖.....	46
圖 3-5	5 L 氣舉式發酵槽裝置圖.....	47
圖 4-1	突變後不同 γ -亞麻酸含量之菌落數目.....	49
圖 4-2	突變後不同 γ -亞麻酸含量菌落之 Biomass 比較.....	49
圖 4-3	不同稀釋倍率時 <i>M. isabellina</i> 於 Agar plate 上之生長情形.....	50
圖 4-4	菌體培養時間對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響.....	51
圖 4-5	<i>M. isabellina</i> 於搖瓶內進行液態培養 144 hr 之生長情形.....	52
圖 4-6	不同含水量對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響.....	54

圖 4-7	基質切塊示意圖	55
圖 4-8	切塊(左)與不切塊(右)之生長情形	55
圖 4-9	基質切塊對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響	56
圖 4-10	添加界面活性劑 tween80 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響	57
圖 4-11	添加不同植物油對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響	61
圖 4-12	添加不同比例植物油對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響	62
圖 4-13	添加不同比例植物油並加入 tween80 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響	63
圖 4-14	添加不同比例 Hexadecanol 並加入 tween80 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積 之影響	67
圖 4-15	以 Hexadecanol 取代 Glucose 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響	69
圖 4-16	兩階段溫度變化對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響	71
圖 4-17	5 L 攪拌式發酵槽批次發酵對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響	73
圖 4-18	5 L 氣舉式發酵槽批次發酵對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響	73
圖 4-19	攪拌式與氣舉式發酵槽之 γ -亞麻酸累積量比較	74
圖 4-20	攪拌式與氣舉式發酵槽之 GLA/Biomass 比較	74
圖 4-21	攪拌式與氣舉式發酵槽之菌體濃度比較	75
圖 4-22	<i>M. isabellina</i> 於 5 L 攪拌式發酵槽內培養 120 hr 之生長情形	76
圖 4-23	<i>M. isabellina</i> 於 5 L 氣舉式發酵槽內培養 120 hr 之生長情形	76

圖 4-24	通氣量 2 vvm 時菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響	77
圖 4-25	不同通氣量之 γ -亞麻酸累積量比較	78
圖 4-26	不同通氣量之 GLA/Biomass 比較	78
圖 4-27	不同通氣量之菌體濃度比較	79
圖 4-28	添加 2 %Hexadecanol 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響	80
圖 4-29	添加 2 %Hexadecanol 並加入 tween80 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響	81
圖 4-30	以 Hexadecanol 取代 Glucose 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響	82
圖 4-31	添加 Hexadecanol 之 γ -亞麻酸累積量比較	84
圖 4-32	添加 Hexadecanol 之 GLA/Biomass 比較	84
圖 4-33	添加 Hexadecanol 之菌體濃度比較	85
圖 4-34	以 Hexadecanol 取代 Glucose 之 γ -亞麻酸累積量比較	87
圖 4-35	以 Hexadecanol 取代 Glucose 之 GLA/Biomass 比較	87
圖 4-36	以 Hexadecanol 取代 Glucose 之菌體濃度比較	88
圖 4-37	兩階段溫度變化對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響	90

表目錄

表 2-1	Oil content of some microorganisms (Yang et al., 2009)	5
表 2-2	Lipid composition of some microorganisms (Yang et al., 2009)	7
表 3-1	實驗藥品清單	27
表 3-2	實驗儀器清單	29
表 3-3	種子培養基	32
表 3-4	發酵培養基	33
表 4-1	不同含水量對 γ -亞麻酸累積之實驗數據	54
表 4-2	基質切塊對 γ -亞麻酸累積之實驗數據	56
表 4-3	添加界面活性劑 tween80 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之實驗數據	58
表 4-4	添加不同植物油對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之實驗數據	61
表 4-5	添加不同比例植物油對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之實驗數據	62
表 4-6	添加不同比例植物油並加入 tween80 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之實驗數據	63
表 4-7	各油品脂肪酸組成	64
表 4-8	各油品價格	65
表 4-9	添加不同比例 Hexadecanol 並加入 tween80 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之實驗數據	67

表 4-10	以 Hexadecanol 取代 Glucose 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之實驗數據	69
表 4-11	兩階段溫度變化對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之實驗數據.....	71
表 4-12	攪拌式發酵與氣舉式批次發酵策略之動力學參數	75
表 4-13	不同通氣量批次發酵策略之動力學參數.....	79
表 4-14	添加 Hexadecanol 批次發酵策略之動力學參數	85
表 4-15	以 Hexadecanol 取代 Glucose 批次發酵策略之動力學參數.....	88
表 4-16	兩階段溫度變化批次發酵策略之動力學參數	90
表 4-17	對於菌體生長與 γ -亞麻酸累積之比較，各發酵槽實驗之動力學參數....	91
表 4-18	提升 γ -亞麻酸累積之搖瓶實驗與文獻之比較.....	92
表 4-19	提升 γ -亞麻酸累積之發酵槽實驗與文獻之比較.....	93

第一章 緒論

近二十年來，由於人們對養生健康和環境汙染的日益重視，因此利用生物方法生產 γ -亞麻酸(GLA)和生質柴油日益受到重視。目前國內外生產的 γ -亞麻酸主要來源於月見草，此植物原產於北美，而 γ -亞麻酸亦可利用微生物發酵方法大量生產。基於成本、氣候、運輸、量產等因素考量，微生物發酵法具有較大的開發前景。

目前發現能積累 γ -亞麻酸的微生物主要是一些真菌和微藻，其中真菌研究較多的有被孢黴屬(*Mortierella*)、毛黴屬(*Mucor*)、枝黴屬(*Thamnidium*)、小克銀漢黴屬(*Cunnigharriella*)、根黴屬(*Rhizopus*)、須黴屬(*Phycomyces*)、接黴屬(*Zygorhynchus*)和犁頭黴屬(*Absidia*)等，藻類的研究主要集中在螺旋藻(*Spirulina*)。但藻類的培養受外界條件的影響較大，用它生產多不飽和脂肪酸有一定難度，真菌在自然界分佈廣且易培養，所以目前利用真菌發酵生產 GLA 已經成為國內外研究熱點。

Mortierella isabellina 是一株高產油脂之真菌，而在其所累積的油脂中不飽和脂肪酸所佔之含量高，含有多種不同功能之脂肪酸， γ -亞麻酸則為其中一種脂肪酸。*M. isabellina* 不同於其他穀類作物，不需要大量的種植面積，也更具有細胞生長快速、可進行高密度細胞培養等優點，因此生產成本遠較傳統農作物低。故本實驗選用 *M. isabellina* 來進行 γ -亞麻酸的生產研究。

第二章 文獻回顧

2.1 脂肪酸

脂肪酸是一種羧酸化合物，由碳氫組成的烴類基團連結羧基所構成。脂肪酸分為飽和脂肪酸、單元不飽和脂肪酸及多元不飽和脂肪酸。

飽和脂肪酸是指結構上沒有雙鍵的脂肪或脂肪酸鏈，長鏈飽和脂肪酸性質穩定，且脂肪酸的飽和程度越高、碳鏈越長，則燃點越高，而動物性食物中以長鏈飽和脂肪酸為主，所以常溫下呈固態。多數動物油都含有較高比例的飽和脂肪酸組成，相較於天然不飽和脂肪酸較高的植物油而言，被認為過量攝取更容易導致人的心血管方面疾病，但亦有眾多研究指出飽和脂肪酸與心血管疾病的風險兩者間並無直接的關係(Ascherio et al., 1996; Mozaffarian et al., 2004)。

不飽和脂肪酸是指至少含有一個雙鍵的脂肪或脂肪酸鏈。當雙鍵形成時，一對氫原子會被消除，因而與碳原子相結合的氫原子未達到最大值，即為「不飽和」。在細胞的新陳代謝中，不飽和脂肪所產生的能量相比飽和脂肪較少。脂肪的雙鍵數量越多，其過氧化的可能性越高，從而越容易對人體健康不利(Ascherio et al., 1996)。

2.1.1 γ -亞麻酸

γ -亞麻酸，GLA (Gamma- Linolenic Acid) 是一種 ω -6 系列多不飽和脂肪酸。 γ -亞麻酸是人體不能自行製造的，必須從食物中攝取的物質，除母乳外只存在於少數植物中，如月見草、黑醋栗、琉璃苣草等。

γ -亞麻酸為全順式 6, 9, 12 十八碳三烯酸，分子式 $C_{18}H_{30}O_2$ ，為無色油狀液體，在空氣中極易被氧化。它是一種人體的必需脂肪酸，在人體內由亞油酸轉化而來，繼而被轉化為雙高亞麻酸 (dihomo- γ -linolenic acid, DGLA) 及花生四烯酸 (arachidonic acid, ARA)，再轉變成前列腺素 E1 (PGE1)、白三烯 (LT) 和前列環素 (PGI2) 等。 γ -亞麻酸具有廣泛的生理活性和明顯的藥理作用，它可以降血脂，抗血栓性心腦血管疾病，預防和治療高血壓、動脈粥樣硬化。同時又能夠抗菌，抗炎，抗腫瘤，抗糖尿病，抗 HIV 感染等，在美容、化妝品行業也有應用，對月經前期綜合症具有一定療效，被高度評價為“21 世紀功能性食品主角”(Keen H. et al., 1993)。

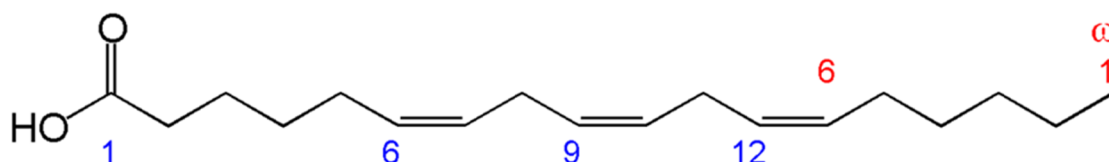


圖 2-1 γ -亞麻酸結構

2.2 產油微生物

當全球的生質柴油產能急速擴張，歐美、東南亞國家開始大量種植大豆、玉米等，提煉植物油來供給生產料源，但植物油佔地面積大且受制於季節氣候的改變，所以為符合這項需求，研發植物油以外的其他來源的油脂正在迅速發展中，欲增加全球油脂產量並降低對於生態系的衝擊，其中一個途徑是使用產油微生物（oleaginous microorganisms）的油脂，產油微生物包括微藻、細菌、真菌與酵母菌（Liu et al., 2014），與產油植物比較，產油微生物培養不受限於耕地，因此不會與食品的生產競爭。在細胞內，若可累積超過 20 % 的油脂，即可稱為產油微生物(Venkata Subhash et al., 2011)，如表 2-1 為微生物可累積的油脂比例。

表 2-1 Oil content of some microorganisms (Yang et al., 2009)

Microorganisms	Oil content (% dry wt)	Microorganisms	Oil content (% dry wt)
Microalgae		Yeast	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
Bacterium		Fungi	
<i>Arthrobacter sp.</i>	>40	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38	<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25	<i>Humicola lanuginosa</i>	75
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24	<i>Mortierella vinacea</i>	66

2.2.1 微生物油脂

由產油微生物生產的油脂，或稱為單細胞油脂(single cell oil) (Bonturi et al., 2015)，微生物在一定條件下利用碳源、氮源和無機鹽類生產的油脂，它可以作為花生四烯酸和二十二碳六烯酸的來源。這些油脂在嬰幼兒食品和老年人保健食品中應用廣泛。現在已經有明確臨床證據表明腦組織中的脂肪酸很大一部分是花生四烯酸和二十二碳六烯酸。它們可以促進嬰兒的神經和智力發育。另外，花生四烯酸可以有助於減少冠心病的發生。除此之外，也可利用微生物培養生產 EPA、DHA 等營養價值高且具有特殊保健功能的油脂。

大部分微生物油的脂肪酸組成和一般植物油相近，如表 2-2，以 C16 和 C18 系脂肪酸，如油酸、棕櫚酸、亞油酸和硬脂酸為主要，微生物油脂可替代植物油脂生產生質柴油。由於技術原因，過去單細胞很少有規模化生產的報導，但隨著工業生物技術的發展，微生物發酵法生產油脂之技術已不斷的發展與成熟。

微生物油脂是人類繼植物油脂、動物油脂之後開發出的又一食用油脂新資源。近半個世紀以來，世界上許多國家如英國、美國和荷蘭等在這方面取得了較大成果，甚至在歐洲、中東、南亞和澳洲等地已允許將某些微生物油脂添加到保健食品中(Geng et al., 2010)。

表 2-2 Lipid composition of some microorganisms (Yang et al., 2009)

Microorganisms	Lipid composition (w/total lipid)					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Microalgae	12-21	55-57	1-2	58-60	4-20	14-30
Yeast	11-37	1-6	1-10	28-66	3-24	1-3
Fungi	7-23	1-6	2-6	19-81	8-40	4-42
Bacterium	8-10	10-11	11-12	25-28	14-17	-

2.3 微生物產油機制

一般而言，油脂性微生物產油的要素可分為兩部分(Ratledge C. et al., 2004)：

- I. acetyl-CoA：能連續的提供細胞為了產生脂肪酸合成酵素所需能量的前驅物。

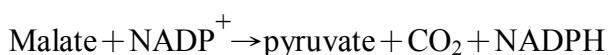
acetyl-CoA 之生成機制：

1. 當氮源用時，細胞內 AMP deaminase 活性提升，活性約為氮源尚未用盡時的五倍。
2. 隨著 AMP deaminase 活性提升，細胞內與粒線體中的 AMP 濃度下降。
$$\text{AMP} \rightarrow \text{inosine } 5' - \text{monophosphate} + \text{NH}_3$$
3. 由於 AMP 濃度下降，isocitrate dehydrogenase 也跟著停止運作。
4. isocitrate dehydrogenase 的停止，造成 isocitrate 無法被代謝並且藉著 Aconitase 與 citric acid 達成平衡。
5. 因此 citrate 累積於粒腺體內，而足夠的 citrate 進入細胞質後，被 ATP:citratylase 切斷產生了 acetyl-CoA 和 oxaloacetate。
$$\text{Citrate} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightarrow \text{acetyl-CoA} + \text{oxaloacetate} + \text{ADP} + \text{P}_i$$

- II. NADPH：能充分地提供脂肪酸合成過程中所需的還原劑。

NADPH 之生成機制：

經由 malic enzyme 可得 NADPH:



以上文字敘述可由圖 2-2 表示：

綜合以上，可由圖 2-3、2-4 表示完整的油脂累積機制：

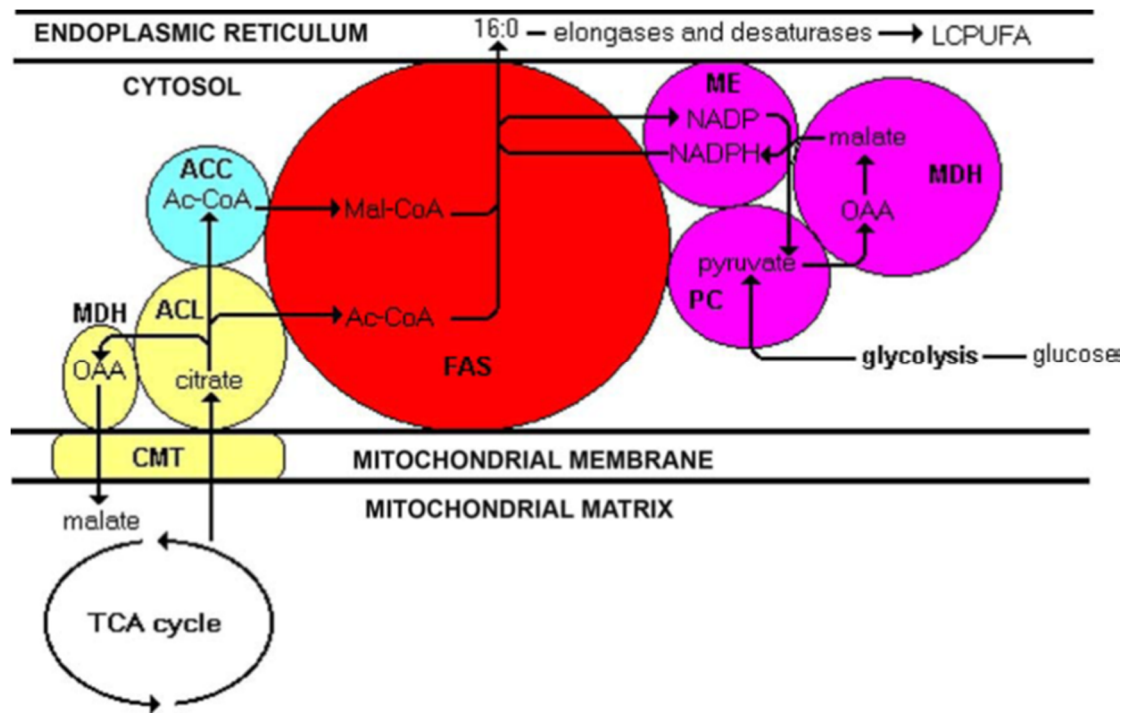


圖 2-3 脂肪酸累積代謝圖 (Ratledge C. et al., 2004)

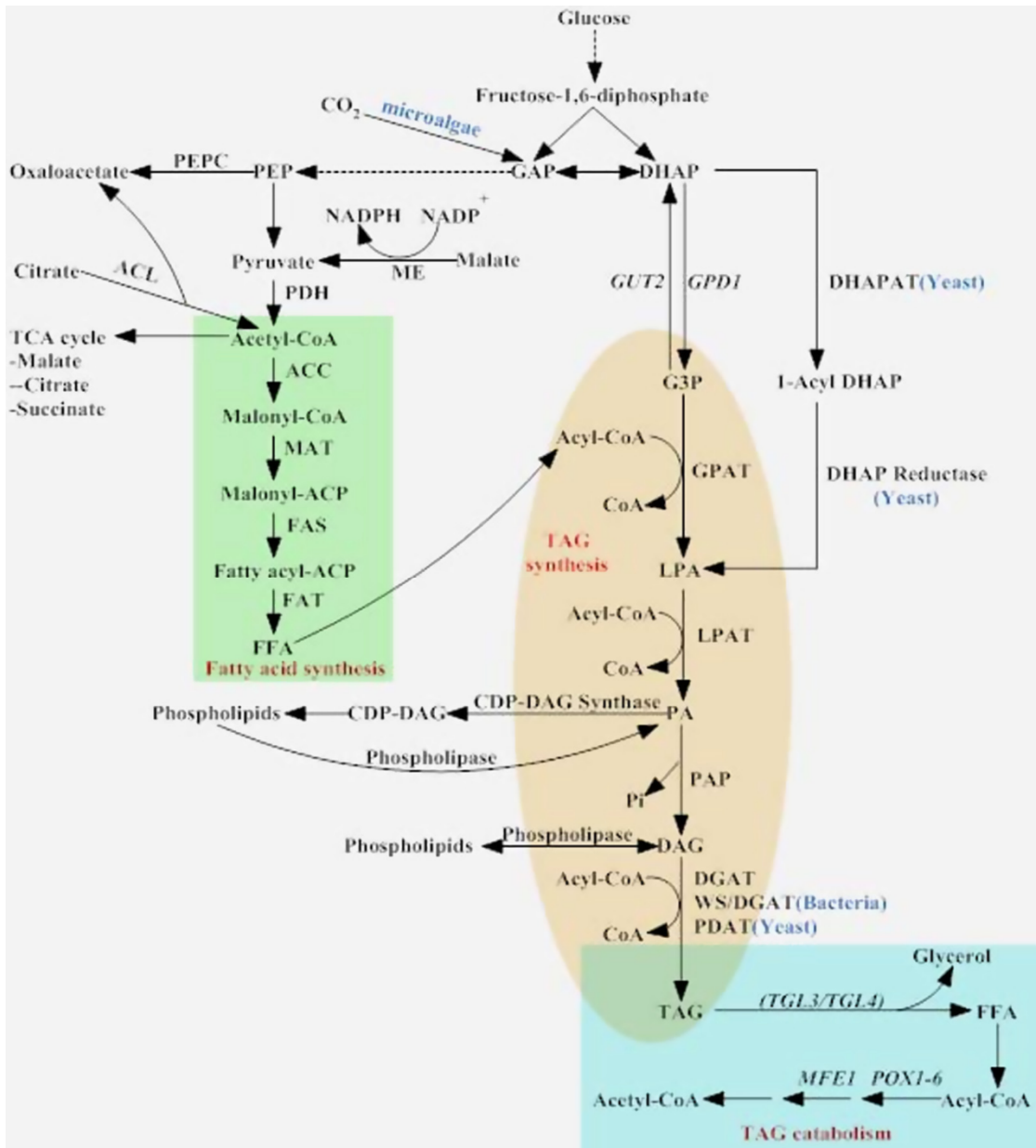


圖 2-4 The fatty acid and TAG biosynthesis pathway in microorganisms (Liang et al., 2013)

2.4 影響微生物油脂產量因子

微生物在細胞內累積油脂的生理循環，已經獲得充分的研究，根據文獻的佐證，微生物生長在碳源（甘油、葡萄糖、蔗糖等）過剩與相對氮源（peptone、硫酸銨等）受到限制的條件下(Zhang et al., 2014)，才能更有效的產生並儲存油脂於細胞中。因此，微生物成長與累積油脂受到培養基中碳氮比（carbon-to-nitrogen ratio）和其他因素，如溫度、pH、無機鹽與微量元素等影響。

2.4.1 溫度

環境中，溫度對於微生物的生長和產物累積有重大的影響性，由於溫度會直接的影響細胞中酵素的反應及活性，又間接與菌體的生長和產物相關，文獻中指出，溫度的改變確實能影響脂質的生成。根據溫度控制之文獻指出，在發酵的早期階段(細胞生長階段)相對的高溫會利於細胞生長及葡萄糖消耗；然而適度的低溫在發酵後期階段(油脂累積階段)則可以增加油脂產生(Peng et al., 2010)。

2.4.2 pH 值

培養基的酸鹼值往往左右了培養基裡養分的溶解度，以及對微生物的質傳，甚至影響與生長有關的酵素反應，而培養基中 pH 值的改變也會影響細胞內外的離子平衡、細胞的滲透性及細胞膜的結構組成改變。根據文獻指出，*M. isabellina* 在偏酸性的環境下，能獲得較快的細胞生長速率及較高的油脂含量(Li et al., 2015)。

2.4.3 碳源和氮源

影響微生物生長最重要的就是營養源，直接關乎培養基的組成，特別是基質組成中占重要比例的碳源和氮源，影響微生物生理狀態的程度更為直接。碳源和氮源是微生物合成細胞時所需要的成分，但在碳源足夠而氮源欠缺的情形下，微

生物不再增加菌體濃度，而是將所吸收的碳源轉為脂質。因此，選擇適合的碳源與氮源來培養油脂性的真菌是使其達到高產油量的關鍵。

2.4.4 碳源

碳源為供應細胞生長的能量以及骨架形成的必須來源，若採用有機物作為碳源則稱為異營（heterotrophic）生物，反之如果採用二氧化碳作為碳源，則稱為自營（autotrophic）生物。碳源雖可提供細胞良好的生長，但因濃度高時培養基的滲透壓也較高，故濃度過高也會對菌體有抑制情形出現。

2.4.5 氮源

氮源是構成菌體蛋白質和核酸的主要元素，一般而言，氮源並不提供菌體所需能量，氮源種類可分為：(1) 無機氮源：例如銨鹽與其他含氮的無機鹽類如氯化銨、磷酸二銨、硝酸銨、硫酸銨等；(2) 含碳的有機氮源：例如 Yeast extract、黃豆粉、尿素、peptone 等。

2.4.6 無機鹽和微量元素

磷在細胞能量轉移方面扮演了重要的角色，磷脂質與核酸的合成也需要有磷的存在，因 ω -3系多元不飽和脂肪酸主要存在細胞的極性之脂質中，如磷脂質，因此磷也會影響多元不飽和脂肪酸的合成。

另外，微生物的生長也需要硫、矽、鎂、鐵、銅以及鋅等元素，一般為酵素的輔因子，硫為胺基酸組成的元素之一，可於不同的胺基酸與維生素中發現；矽是微生物膜組成因子之一，是產生不飽和脂肪酸之 EPA 的必需營養因子，缺乏矽時微生物則會利用細胞內儲存的矽，以維持生理活性功能。

2.5 發酵法生產 γ -亞麻酸之影響因子

在大多數微生物體內，多元不飽和脂肪酸都是從丙酮酸合成乙醯-CoA開始，經脂肪酸從頭合成途徑轉化成軟脂酸，再經一系列的延長酶和去飽和酶催化成 GLA、ARA、EPA、DHA 等多元不飽和脂肪酸。從圖 2-5 可以看出 γ -亞麻酸的合成與多種酶有關。透過對多元不飽和脂肪酸代謝路徑的分析，可以調控微生物發酵生產 γ -亞麻酸之合成。而根據文獻指出，亦可經由控制碳氮源、金屬離子、菌體型態及溫度等因子來使 γ -亞麻酸之合成增加。

2.5.1 碳氮源

碳源是微生物生長的能量來源，同時又是生產 γ -亞麻酸的原料物質，在代謝調控過程中有著極其重要的作用。可用於發酵生產 γ -亞麻酸的主要碳源物質有澱粉、葡萄糖、蔗糖、麥芽糖、乳糖、糖蜜等，目前葡萄糖用的最多。培養基中葡萄糖的含量會直接影響到 γ -亞麻酸的產量，通常情況下，葡萄糖越多，菌體濃度越大，則 γ -亞麻酸的產量越大(Fakas et al., 2009)。

氮源在微生物油脂發酵過程中主要是作為限制因素，與微生物菌體的濃度有著直接相關，並同時影響著 γ -亞麻酸的合成。在氮源限制的發酵過程中，當氮源利用完全時，重要的脂肪酸才開始大量的累積(Papanikolaou et al., 2004)。

對大多數產油微生物來說，生長在初始 C:N < 20 的培養基中通常不能累積油脂，最適的油脂累積環境 C:N 為 30~80(Farhila Muhid et al., 2008)。隨著碳氮比的提高，菌體濃度會逐漸提高，油脂含量則會先增加後減少(Chen et al., 1996)。

2.5.2 金屬離子

金屬離子作為多種酶的輔酶，同時又是維持細胞內外滲透壓平衡的重要因子，在微生物合成代謝中扮演著重要的角色。根據文獻指出， Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 對油

脂的影響較大，這三種離子同樣影響著 γ -亞麻酸的含量，其中 Zn^{2+} 的影響最大 (Farhila Muhid et al., 2008)，同時也發現金屬離子的有無對菌體濃度沒有影響。

2.5.3 菌體型態

在真菌的發酵過程中，型態控制一直是研究的焦點。真菌發酵通常有兩種型態：一是絲狀；二是球狀。在絲狀情況下，發酵液很容易形成非牛頓流體，極其黏稠，降低攪拌及通氣的效率。菌球形式由於可以降低發酵液黏度，被廣泛用於絲狀真菌的發酵。然而，球狀的大小在發酵過程中難以保持恆定，一直是絲狀真菌面臨的一個難題。菌球的形成與大小主要取決於培養時的各種因素，如 pH、接菌量及攪拌速度等 (Kang H.S. et al., 1989)。

2.5.4 溫度

溫度一方面影響細胞膜的流動性，隨著溫度的變化，脂肪酸的分布也隨之變化，低溫時趨於形成不飽和脂肪酸，以維持膜功能；另一方面亦影響溶液中氧的溶解度，氧是去飽和酶催化脫氫的電子受體，在不飽和脂肪的形成中扮演著重要的角色 (Kendrick et al., 1992)。根據文獻指出，在對 *Mucor* sp. LB-54 的培養時發現，當培養溫度為 28°C 時，GLA 占總脂肪酸的 15%，當溫度降低為 12°C 時，GLA 的含量達到了 24%，因此建立兩步溫度調控策略，在前期將培養溫度訂為 28°C，培養 5 天，後期將溫度降為 12°C，培養三天，最後 GLA 的總產量從 44 mg/L 升高為 74 mg/L，提高了 68% (P.O. Carvalho et al., 1999)。

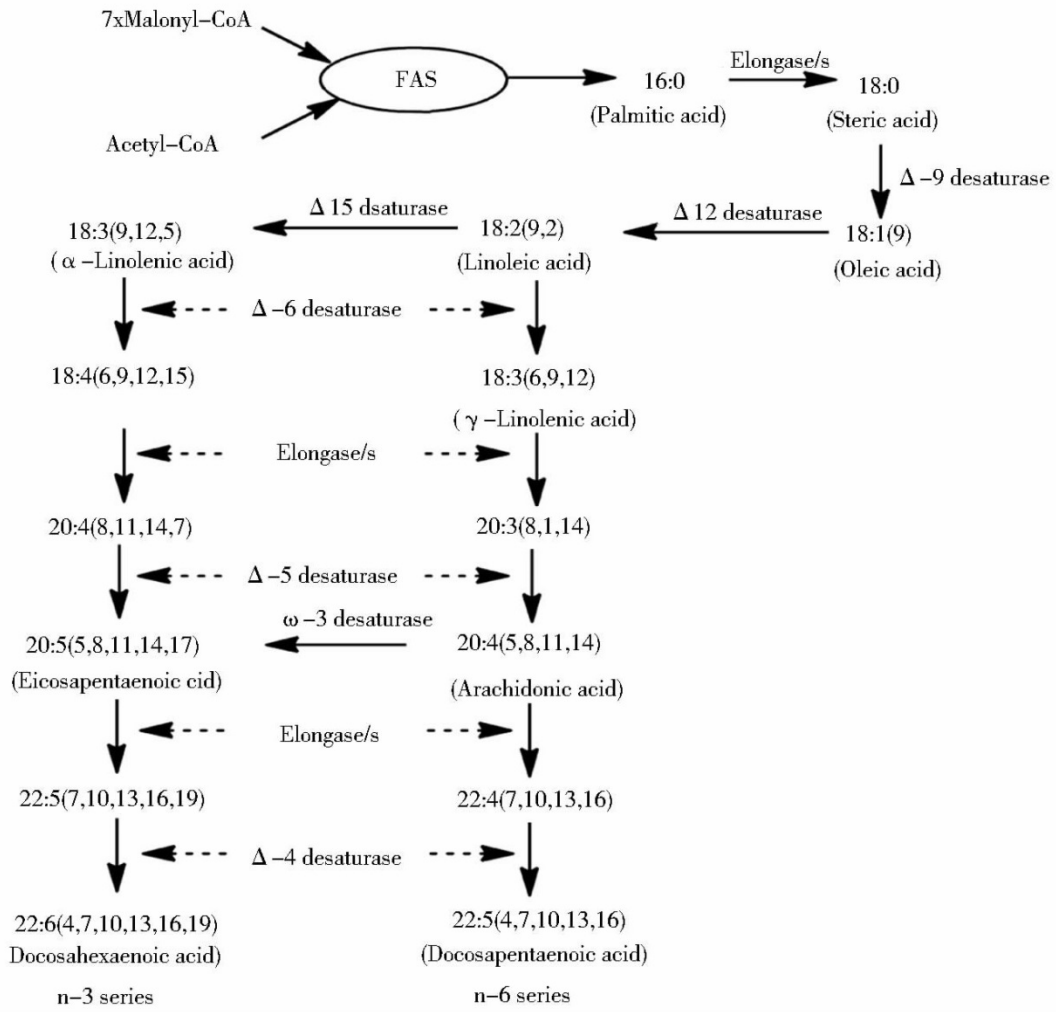


圖 2-5 微生物多元不飽和脂肪酸的代謝路徑 (Ratledge C. et al., 2004)

2.6 固態發酵培養之影響因子

固態發酵是利用一些固態之營養物質，在較乾燥之環境下培養微生物，而微生物在利用固態營養基質時，會以自然攀附或穿透固態基質等方式生長，形成一特殊生長型態，此種生長型態對某些微生物之二次代謝產物生產是極為重要(Viniegra-Gonzalez et al., 2003)。固態發酵法中，菌體生長也受許多條件影響，如濕度、溫度、pH 值以及顆粒大小等。

2.6.1 水分含量、濕度(moisture)

在真菌和細菌的固態發酵系統中，高含水量的效應使得多孔性下降、培養基顆粒結構瓦解、黏性增加、氣體體積減少、使得氣體交換也降低、氧氣傳輸降低使得氣生菌絲的形成增加。而太低的含水量卻造成固態培養基中營養物的溶解度降低、膨脹效果變差和增加水的張力 (Ramesh and Lonsane, 1990)。最適水分的選擇取決於微生物與基質本身。對一般真菌而言，最適水分介於 40 %與 80 %之間。對於相同微生物而言，生長在不同基質，其最適水分含量也會明顯不同。

濕度會影響到水的活性，文獻指出水活性對微生物生長及代謝息息相關 (Pastrana et al., 1996)，菌體生長與產物生成兩種適用的水活性會不同，最適水活性會依攪拌速率與培養溫度而不同。此外，發酵過程中，產物生成與基質水解皆會導致水活性改變。而濕度較高的情況下是比較適合菌體生長及累積脂肪酸的 (Ayerim Hernández-Almanza et al., 2014)。發酵過程中常利用通入潮濕的空氣或間歇性的噴灑水來控制水活性，而通入飽和氣體通常被使用來增加基質的水含量。通入氣體的相對濕度通常為 60 %~80 %。理想上，為了避免基質流失或增加水分，必須將通入的氣體與基質的水活性一致。實際上，發酵會產生水分，為了達到蒸發冷卻，通入的氣體必須稍微乾於基質。(賀士紅, 2000; Shuler et al., 1992; Chisti et al., 1999)。

2.6.2 溫度 (Temperature)

固態發酵最大菌體濃度比典型的液態發酵之菌體濃度還低，但因為固態發酵只有少許的水能吸收熱量，所以每單位質量發酵物所產生熱量會使溫度快速上升，導致大規模發酵的溫度會難以控制。因此代謝熱的移除有時變成最主要的限制。而發酵過程的溫度控制方面，幾乎都是藉由蒸發冷卻的方法，利用較乾的空氣通入來提供較好的冷卻效果，或者可藉由間歇性的噴灑冷卻水來控制溫度以及防止基質脫水。而對於大量堆積的基質而言，間歇性的攪拌也可幫助熱移除。故對於菌體培養來說，溫度梯度問題的解決是必要的(Chisti et al., 1999)。

2.6.3 pH 值

對於固態發酵而言，通常都沒有 pH 的控制。細菌耐酸鹼的能力較差，故對於某些無菌過程都將初始 pH 調到 4 或以下，可防止細菌汙染，而酵母菌與真菌通常可以忍受較酸的環境。發酵過程中 pH 皆會變化，而固態發酵中，大部分的基質都是很有效的緩衝劑，可防止發酵過程 pH 劇烈變化而影響菌體生長。發酵過程中保持 pH 穩定對某些發酵很重要，且酵素與某些二次代謝產物的穩定性也會受 pH 影響，即使產生速率不受 pH 影響，但因為產物不耐酸鹼而被破壞，導致總產率下降(Chisti et al., 1999)。

2.6.4 顆粒大小

通常顆粒較小的培養基會有較大的總表面積，能夠提升微生物與培養基接觸的機會，可是若基質顆粒過小，反而有可能會造成培養基形成團塊影響養分的傳遞，干擾氧氣的傳輸反不利於微生物生長。相反地，顆粒較大的培養基提供較佳的通氣環境 (因增加顆粒間的空隙)，但卻使微生物接觸培養基的機會受到表面積限制。因此適當大小的培養基顆粒是很重要的 (Pandey et al., 1999)。

2.7 被孢黴 (*Mortierella*)

被孢黴是種生活在土壤中的腐蝕性微生物，以腐爛的樹葉或有機物為食物。屬於接合菌門中毛黴亞門的孢黴屬(Hibbett et al., 2007)，目前已知的被孢黴有 85 種之多(Kirk et al., 2008)。與毛黴相比起來被孢黴的特徵是更容易朝隔膜方向生長，同時孢子囊更小，含有較少的孢子與孢子囊枝。被孢黴在實驗中大多是生長在馬鈴薯葡萄糖瓊脂或玉米瓊脂(Chesters C.G.C et al., 2001, Park E.Y. et al., 2001)。被孢黴細胞呈球形、卵圓形，細胞直徑為 0.5 至 1.5 微米。孢黴的形成是由孢子囊藉由孢質溶合後產生接合孢子發展而來；被孢黴的接合孢子為裸孢子或是由無菌菌絲圍繞所產生的窩狀結構，有利於子實體的前期生長。

被孢黴目前最常用來生產各種多元不飽和脂肪酸，包含：次亞麻油酸(γ -linolenic acid)花生四烯酸(arachidonic acid)等(Park E.Y. et al., 2015)。因其富含高油脂累積，故可用於生產微生物油脂及脂肪酸。

2.7.1 菌種選擇-*Mortierella isabellina*

Mortierella isabellina 為絲狀真菌，其分類地位是真菌界(*Fungi*)、接合菌門(*Zygomycota*)、被孢毛黴亞門(*Mortierellomycotina*)、被孢毛黴目(*Mortierellales*)、被孢毛黴科(*Mortierellaceae*)、被孢黴屬(*Mortierella*)。其最主要生長於土壤及腐爛枯枝落葉中。營養方式主要為腐生及少數寄生，廣泛的分布於自然界許多不同環境中。最主要的形態特徵是其孢子囊柄頂端只有發展未完全的中軸或是無中軸(columella)，有不規則的菌絲隔板，而且在孢子囊柄的底部會有逐漸膨大的現象(張承豪, 2013)。在外觀上，細胞的型態呈卵圓形，適合生長在 20~30°C，pH 5~6 的環境。而 *M. isabellina* 所累積的油脂中不飽和脂肪酸所佔之含量高，適合作為本實驗之菌種。

2.8 幫助溶氧物質 (Oxygen-vector)

在氣舉式發酵槽中，利用氣體帶動培養基的流動，藉由流動達到質傳也提供菌體所需的氧氣，在大型的槽體中增加溶氧和氣體在培養中滯留時間可有效提升其菌體產量，其中一個方法就是添加非水相態且能幫助增加溶氧的物質 (Oxygen-vector) (Narta et al., 2010)。關於 Oxygen-vector 有很多可能的機制可幫助其作用於培養基中，其中較有可能的是假設 Oxygen-vector 可吸附至氣泡表面，形成不完整的薄膜，而氧氣就可經由此層薄膜在氣泡與微生物之間擴散傳遞 (Mc Millan et al., 1987)，其可以有效的幫助提升溶氧、成本低廉、低危害性、降低能源消耗等優點，常使用的有烴類、脂肪酸等 (Jianlong., 2000; Rols et al., 1990; Xu et al., 2007)。

2.8.1 界面活性劑 Tween80

界面活性劑依其性質而言，其吸附配向力大，具有某些生理活性，在目前實際的應用領域上，陽離子性界面活性劑對於革蘭陽性及陰性菌具有強大抗菌性 (馮昌宇, 2009)。Tween-80 主要是由兩種不飽和脂肪酸：油酸(oleic acid, C18:1, 約 70%)、亞麻油酸(linoleic, C18:2)以及兩種飽和脂肪酸：硬脂酸(steric acid, C18:0)、棕櫚酸(palmitic acid, C16:0)所組成。

在文獻當中指出，以非離子界面活性劑 Tween80 為培養基碳源，對於以油脂類為碳源的微生物而言，Tween80 的水解速率較慢，在培養過程中以控制釋放的模式，可以有效地避免了油酸抑制的問題(Chen et al., 2001)，也有研究顯示在培養基中添加非離子界面活性劑 Tween 系列，有助於微生物降解碳氫化合物，對於生態的保育有相當好的助益 (莊晟榜, 2002)，在文獻中也有利用添加 Tween80 幫助溶氧以提升 *Streptomyces* 菌體產量，添加 0.5% 的 Tween80 後增加 1 g/L 的菌體濃度(Xu et al., 2014)。

2.9 化學誘變劑 NTG

化學誘變劑是指可以作為誘變劑的化學物質。化學誘變劑包括在 DNA 複製時可替換正常鹼基、引起錯誤的鹼基配對從而造成突變的鹼基類似物；能嵌入雙螺旋的鹼基中使複製時插入一個額外的鹼基，從而造成移碼突變的嵌入劑等。很多化學誘變劑通過添加烷基、芳香基或脫氨基等途徑修飾鹼基。

NTG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 為一化學誘變劑，被廣泛用於誘導突變細菌細胞和酵母細胞，其可導致生物體發生基因的突變。NTG 可使 DNA 與細胞中的各種正常化學組分發生反應而產生自發突變。需氧細胞中的活性氧組分 (ROS) 也會造成鹼基損傷。

2.10 植物油

植物油為由植物來源取得的油脂，通常是由植物種子中取得，主要成分三酸甘油酯依來源不同有多種脂肪酸組合。植物油一詞有時會特別用來指在室溫下會保持液體形態的植物油 (Plant oil)，而在室溫下會保持固體形態的則稱為植物脂 (Plant fat)。人類從很古老的時代就開始使用植物油，主要用於烹調食物之用。熱帶植物油普遍相較於溫寒帶植物油，通常含有較多比例的飽和脂肪酸，因為其於高溫下較為穩定，細胞膜脂結構較不易破壞。

在菌體發酵期間添加少量脂肪酸、植物油或界面活性劑，可刺激菌絲體生長或代謝物的產量。添加 1 % 葵花油於培養基中有助於 *G. lucidum*-二次代謝物的生成，可將多糖含量自 0.13 mg/ml 提升至 0.18 mg/ml (Yang et al., 2000)；利用 *Streptomyces fradiae* 生產 Tylosin，發現以植物油脂作為碳源有助於提升菌量和 Tylosin 濃度(Choi et al., 1996)。故發酵過程中額外添加脂肪酸或植物油對於菌體濃度或者提升二次代謝物確實有其正面效益。

2.11 Hexadecanol

Hexadecanol(1-十六烷醇) 是一種脂肪醇，分子式為 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{OH}$ 。在室溫下，Hexadecanol 為一蠟質的白色固體或薄片。由於最初是從鯨油提煉分離出來的，因此有「鯨蠟醇」之別名。

在液態發酵實驗中，葡萄糖經常被使用作為培養基之碳源。根據文獻指出於培養基中添加 Hexadecanol 可使菌體生產不飽和脂肪酸(Mo. Xian et al., 2001)。雖然 Hexadecanol 之價格較高，但添加少量 Hexadecanol 即可達到與添加葡萄糖 (60g/L) 培養基相同之菌體濃度與脂肪酸累積量。

2.12 發酵策略

2.12.1 液態批次微生物發酵

批次發酵是最普遍用於發酵產品上，其原因是批次發酵是在一個密閉系統及固定濃度的培養基中，接入微生物菌種進行培養，在培養期間，其培養系統沒有與外界物質進行交換作用，所以污染機率較低，但也因為與外界隔絕與工作體積固定，無補充碳氮源，故通常在批次環境下培養，其生產速率偏低。但批次發酵程序簡單且產率高，對於研究初期，液態批次發酵是必要的研究程序。

2.12.2 固態微生物發酵

固態發酵是利用一些固態之營養物質，在較乾燥之環境下培養微生物，而微生物再利用固態營養基質時，會以自然攀附或穿透固態基質等方式生長，形成一特殊生長型態，此種生長型態對某些微生物之二次代謝產物生產是極為重要 (Viniegra-González et al., 2003)。

2.12.3 固態發酵與液態發酵之差異

固態發酵與液態深層發酵主要的不同點如下(Sato and Sudo, 1999):

- (1) 固態發酵，微生物分布在固體表面，微生物生長與產物生成也主要在表面進行。基質不易攪拌均勻，因此培養環境較為不均勻。
- (2) 固態基質的水分含量一般都非常低，必須依基質的物理性質與化學性質而定。對於高水分含量的培養基而言，要穩定通氣通過基質床很困難，通常會發生渠道效應。
- (3) 由於菌體的新陳代謝與生長產生熱，提高了基質的溫度，造成水分的流失。此現象使得固態發酵的控制更具挑戰性。
- (4) 固態發酵的基質通常是天然物質，如：穀類、大豆、農業的生物量、固體廢棄物等。有時產物是整個發酵基質，如傳統性食品:miso、natto、tempeh。
- (5) 一般使用在固態發酵的微生物為黴菌，固態發酵中，黴菌的菌絲型態與液態深層發酵之菌絲型態不同。這兩種菌絲有不同的生理活性、複雜的控制過程。
- (6) 固態發酵對基質床進行攪拌非常困難，某些產物的活性對剪應力非常敏感，所以培養一般是靜態的，除了轉鼓反應器與流體化床發酵槽。

第三章 材料與方法

3.1 實驗材料

3.1.1 菌株

此實驗採用的 *Mortierella isabellina* (圖 3.1)，是購自生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center)，菌種編號：BCRC 31721。

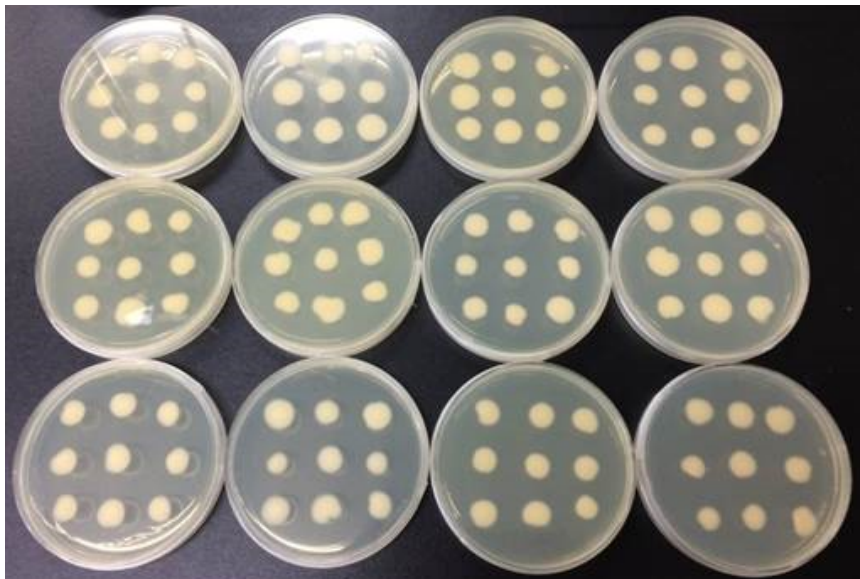


圖 3-1 *Mortierella isabellina* 在 agar plate 上之外觀

3.1.2 實驗藥品

表 3-1 實驗藥品清單

中文名	英文名	廠牌
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
馬鈴薯葡萄糖培養基	Potato dextrose broth	DIFCO BD
酵母萃取物	Yeast extract	DIFCO BD
磷酸二氫鉀	Potassium dihydrogen phosphate	SHOWA
氯化鎂六水合物	Magnesium chloride hexahydrate	SHOWA
氯化鈷六水合物	Cobalt(II) chloride hexahydrate	SIGMA
硫酸亞鐵七水合物	Iron(II) sulfate heptahydrate	HPC
硫酸亞鋅七水合物	Zinc sulfate heptahydrate	SHOWA
硫酸亞錳水合物	Manganese(II) sulfate monohydrate	SCHARLAU
鹽酸	Hydrochloric acid	AENCORE
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	SHOWA
甲醇	Methanol	ECHO
乙醇	Ethanol	ECHO
正己烷	n-hexane	ECHO
甲基硝基硝基胍	Methylnitronitrosoguanidine	SIGMA

界面活性劑	Tween 80	ECHO
十六烷醇	Cetyl alcohol	Alfa Aesar
葵花油	Sunflower oil	Standard Foods
芥花油	Canola oil	Taisun
米糠油	Rice bran oil	Olitalia
軟棕櫚油	Palm oil	SHUN YI
大豆沙拉油	Soybean salad oil	Taisuco

3.2 實驗儀器

表 3-2 實驗儀器清單

儀器設備	廠牌	型號
電子天平	Precisa	BJ 100M
電子微量天平	AND	GR-200
磁石攪拌加熱器	CORNING	PC-420D
桌上型 pH 測試儀	INSPECTED	PL-700PV
高壓蒸氣滅菌釜	TRIDENT	EA635
高壓蒸氣滅菌釜	TOMIN	TM-328
無菌操作台	HIGH TEN	3BH-24
恆溫震盪培養箱	LIAN SHEN	LUS-150
超純水系統	Thermo	Smart2Pure
5 公升氣舉式發酵槽	Biotop	
5 公升攪拌式發酵槽	Biotop	
高效氣相層析儀 FID detector	Thermo	Focus GC
試管震盪器	IKA	MS1 minishaker
紅外線水分蒸發儀	DENVER INSTRUMENT	IR-35
高速中型離心機	Hettich	Universal-32R

高速中型離心機	HERMLE	Z326
數位型離心機	HSIANTAI	CN-2200
組織均質機	HSIANTAI	HG-300D
冷凍乾燥機	PAN CHUM	CT-series
Air compressors	SWAN	DR Series
Vacuums pump	EDWARS	RV Rotary Vane Pumps
超音波震盪破碎儀	MISONIX	S-3000
烘箱	LIAN SHEN	LO-150
超音波震盪器	DECTA	DC300H

3.3 分析方法

3.3.1 菌體濃度分析方法

取出 5 ml 菌液，在轉速 7000 rpm 下離心 10 min，去除上清液取得菌體，再加入 5 ml RO 水，經試管震盪器使菌體與 RO 水充分混合洗去雜質後，再以相同轉速與時間下離心，去除上清液，取出下層菌體並利用紅外線水分蒸發儀，測得菌體乾重(Dry cell weight, DCW)。

3.3.2 γ -亞麻酸濃度分析方法

秤取冷凍乾燥後的菌體 50 mg，加入甲醇/正己烷(1:2)溶液 6 ml 以試管震盪器混合均勻，並以超音波破碎機進行破碎 (功率 125 watt，頻率 20 kHz，作用時間 3 min)，然後靜置萃取 1 hr。再經由離心機以轉速 6000 rpm 離心 10 min，取上清液以 0.3 μ m 針筒過濾器過濾。

利用 GC-FID(Thermo - Focus GC)分析 γ -亞麻酸濃度，分析條件：Column InertCap FFAP (I.D.=0.25mm, Length=30m, df=0.25 μ m)，Col. Temp.：60°C-10°C/min-240°C(30min hold)，Carrier Gas：He 100kPa，Injection：Split flow 50ml/min, 240°C，Detection：FID Range 10⁰, 240°C，注射量 1.0 μ L。

3.4 實驗方法

3.4.1 原始菌種保存

將購自菌種中心的 *Mortierella isabellina* 之冷凍乾燥管，接至種子培養基活化，並放入恆溫培養箱中以 25°C 培養 72 hr，取 0.8 ml 菌液和 0.2 ml 無菌甘油於微量離心管中均勻混合後，放入 4°C 冰箱保存。

3.4.2 培養基組成

3.4.2.1 種子培養基 (Seed culture medium, SM)

依表 3-3 種子培養基之比例配製，並以 1 N HCl 調整 pH 值為 5.5。

表 3-3 種子培養基

Compounds	Concentration (g/L)
Potato dextrose broth	24.0
Yeast extract	8.0

3.4.2.2 發酵培養基 (Fermentation medium, FM)

依表 3-4 發酵培養基之比例配製，並以 1 N HCl 調整 pH 值為 5.5。

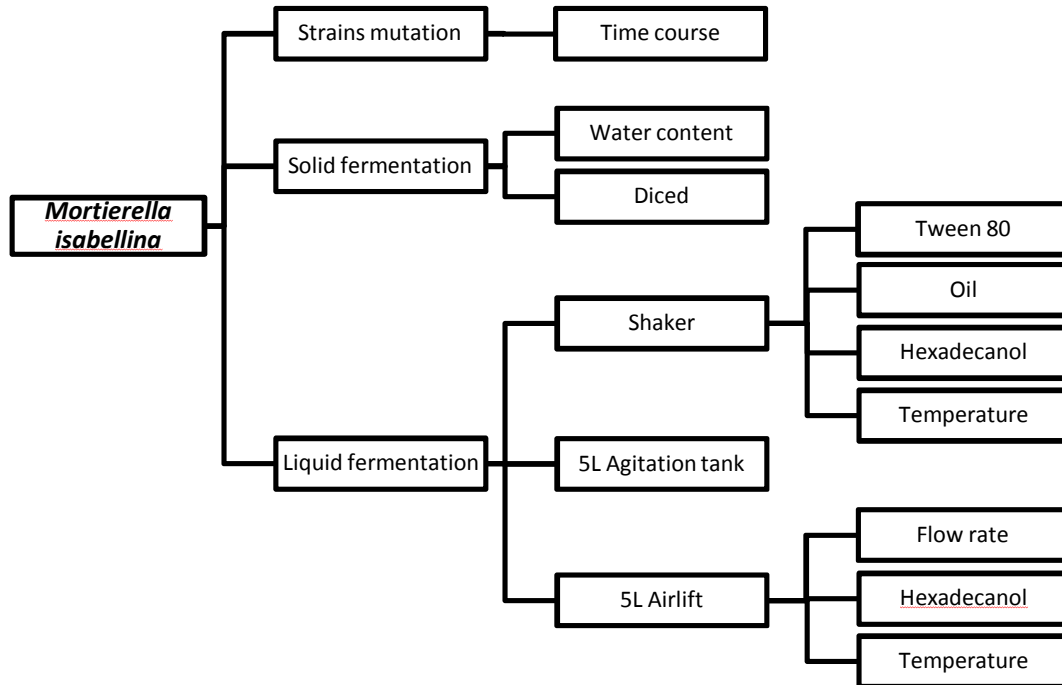
表 3-4 發酵培養基

Compounds	Concentration (g/L)
Glucose	60.0
Yeast extract	2.74
KH ₂ PO ₄	1.0
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.0036
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.00275
MnSO ₄ · H ₂ O	0.0016
ZnSO ₄ · 6H ₂ O	0.0014

3.4.3 接菌

將培養 24 hr 之 Seed medium 接至 Fermentation medium 中，搖瓶、5 L airlift、5 L Agitation tank 之接菌量皆為 Fermentation medium 10%之體積。

3.5 實驗架構



3.6 實驗培養條件

3.6.1 細胞突變發酵程序

3.6.1.1 以 NTG 進行細胞突變

目的：以 NTG 進行細胞突變，篩選出 γ -亞麻酸含量高之菌株

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 離心後將菌體接入新的 SM 培養基中並加入 NTG 誘使細胞進行突變，培養 1hr。
3. 離心後將菌體以滅菌後的 RO 水清洗，接入新的 SM 培養基中，培養 6 hr。
4. 將菌液以滅菌後的 RO 分別稀釋為 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 倍，取稀釋後之 0.1 ml 之菌液塗至 Agar plate 上，待其生長至適當大小後接種於新的 Agar plate 上。
5. 將菌落接種至 SM 培養基內，以均質機將培養液均質，培養 48 hr，進行篩菌。

3.6.1.2 菌體培養時間之影響

目的：突變後 *M. isabellina* 的培養時間對菌體生長與 γ -亞麻酸生成之影響

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。

3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 120 hr，每 24 hr 取樣三瓶。

3.6.2 固態搖瓶批次發酵程序

3.6.2.1 不同含水量之影響

目的：探討固定基質為玉米，在不同含水量下菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 秤取玉米 10 g，並加以磨碎成粉，加入 50 ml 搖瓶中，以逆滲透蒸餾水為溶劑，分別改變整體含水量(40 %、50 %、60 %、70 %)配置成培養基。
3. 以 10 %接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 靜置於溫度 25°C 培養箱中，培養 120 hr。

3.6.2.2 基質切塊之影響

目的：探討藉由基質切塊來增加菌體生長面積以及接觸機會，對菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 秤取玉米 10 g，並磨碎成粉，加入 50 ml 搖瓶中，以逆滲透蒸餾水為溶劑，固定整體含水量 50 %配置成培養基，於滅菌後將培養基進行切塊。

3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 靜置於溫度 25°C 培養箱中，培養 120 hr。

3.6.3 液態搖瓶批次發酵程序

3.6.3.1 添加 tween80 之影響

目的：探討在培養基中加入界面活性劑 tween80 對菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，分別加入不同濃度(0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L)之 tween80，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 120 hr。

3.6.3.2 添加植物油之影響

I. 添加不同植物油之影響

目的：探討添加不同種類植物油對菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，分別加入濃度為 10 % 之葵花油、芥花油、米糠油、軟棕櫚油、大豆沙拉油，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。

3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 120 hr。

II. 添加不同比例植物油之影響

目的：探討添加不同濃度植物油對菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，分別加入不同濃度(1 %、5 %、10 %、15 %) 之葵花油，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 120 hr。

III. 添加不同比例植物油及 tween80 之影響

目的：探討添加不同濃度植物油並加入 tween80 對菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，分別加入不同濃度(1 %、5 %、10 %、15 %) 之葵花油與 tween80 (0.5 g/L)，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 120 hr。

3.6.3.3 添加 Hexadecanol 之影響

I. 添加不同比例 Hexadecanol 並加入 tween80 之影響

目的：探討添加不同比例 Hexadecanol 並加入 tween80 對菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，分別加入不同濃度(1.0 %、1.5 %、2.0 %)之 Hexadecanol 與 tween80 (0.5 g/L)，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 120 hr。

II. 以 Hexadecanol 取代 Glucose 之影響

目的：探討以 Hexadecanol 取代 Glucose 對菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，以 Hexadecanol 取代 Glucose，分別加入不同濃度(1.5 %、2.0 %、2.5 %、3.0 %)之 Hexadecanol 與 tween80 (0.5 g/L)，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 120 hr。

3.6.3.4 兩階段溫度變化之影響

目的：探討培養 120 hr 後以低溫進行菌體老化對菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 120 hr。
5. 培養 120 hr 後再於轉速 150 rpm、溫度 8°C 培養箱中，培養 96 hr，每隔 24 hr 取樣三瓶。

3.6.4 5 L 發酵槽批次發酵程序

3.6.4.1 攪拌式發酵槽與氣舉式發酵槽之比較

目的：探討放大至 5 L 發酵槽並控制 pH 對菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 5000 ml 培養基。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中，分別以攪拌式、氣舉式發酵槽進行培養。
4. 每 12 hr 進行取樣。

3.6.4.2 改變通氣量之影響

目的：探討放大至 5 L 進行培養，改變通氣量對菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 5000 ml 培養基。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中，並改變通氣量分別為 1.5 vvm、2.0 vvm。
4. 每 12 hr 進行取樣。

3.6.4.3 添加 Hexadecanol 之影響

I. 添加 2.0 % Hexadecanol 之影響

目的：探討額外添加 Hexadecanol (2.0 %) 並放大至 5 L 氣舉式發酵槽，對菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，其中添加 Hexadecanol (2.0 %) 並依照表 3-4 配製 5000 ml 培養基。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 每 12 hr 進行取樣。

II. 添加 2.0 % Hexadecanol 並加入 tween80 之影響

目的：探討額外添加 Hexadecanol (2.0 %)與 tween80 (1 g/L)並放大至 5 L 氣舉式發酵槽，對菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，其中添加 Hexadecanol (2.0 %)與 tween80 (1 g/L)與並依照表 3-4 配製 5000 ml 培養基。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 每 12 hr 進行取樣。

III. 以 Hexadecanol 取代 Glucose 之影響

目的：探討以 Hexadecanol (2.0 %)取代原本培養基中 Glucose 並放大至 5 L 氣舉式發酵槽，對菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，其中以 Hexadecanol (2.0 %)取代原本培養基中 Glucose，並依照表 3-4 配製 5000 ml 培養基。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 每 12 hr 進行取樣。

3.6.4.4 兩階段溫度變化之影響

目的：探討放大至 5 L 進行培養，於培養 120 hr 後以低溫進行菌體老化對菌體生長、 γ -亞麻酸生成之影響。

1. *M. isabellina* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 25°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 5000 ml 培養基。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 經培養 120 hr 之後，將溫度降至 8°C 繼續培養。
5. 每 12 hr 進行取樣。

3.7 實驗裝置圖

本實驗所使用的培養裝置，包括搖瓶、5 L 攪拌式發酵槽、5 L 氣舉式發酵槽。

3.7.1 液態搖瓶發酵培養裝置圖

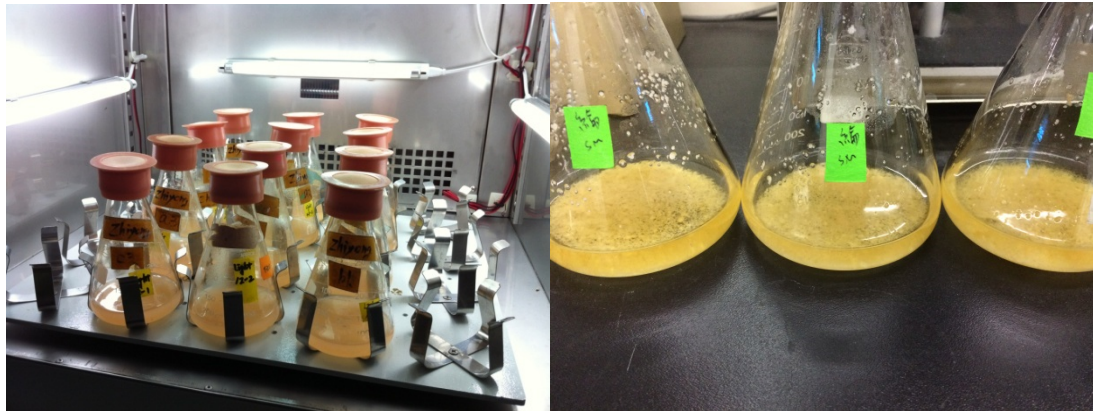


圖 3-2 *M. isabellina* 之液態搖瓶實驗裝置圖

3.7.2 固態搖瓶發酵培養裝置圖

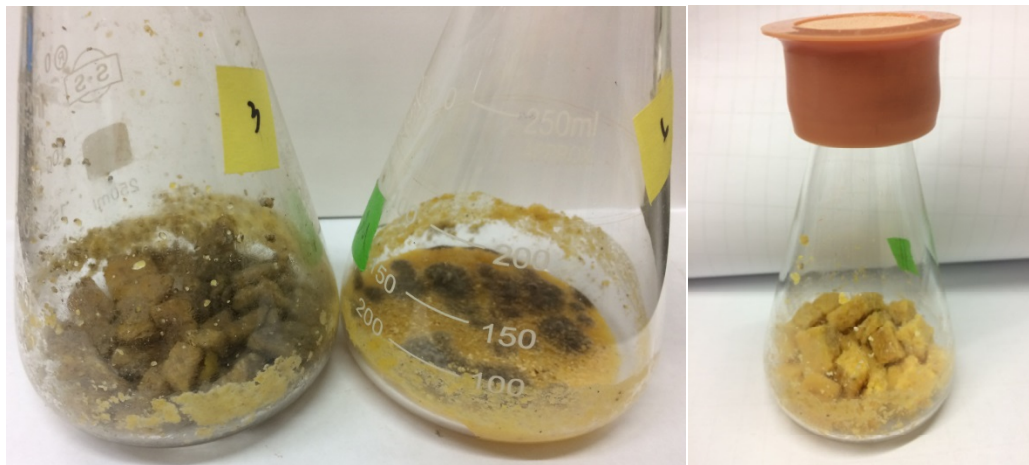


圖 3-3 *M. isabellina* 之固態搖瓶實驗裝置圖

3.7.3 5 L 攪拌式發酵培養裝置圖

本實驗所使用 5 L 攪拌式發酵槽，攪拌棒為六片式攪拌葉片，尺寸如圖 3-4，實際發酵體積為 3 L。



圖 3-4 5 L 攪拌式發酵槽裝置圖

3.7.4 5 L 氣舉式批次發酵培養裝置圖

本實驗所使用 5 L 氣舉式發酵槽，尺寸如圖 3-5，實際發酵體積為 5 L。

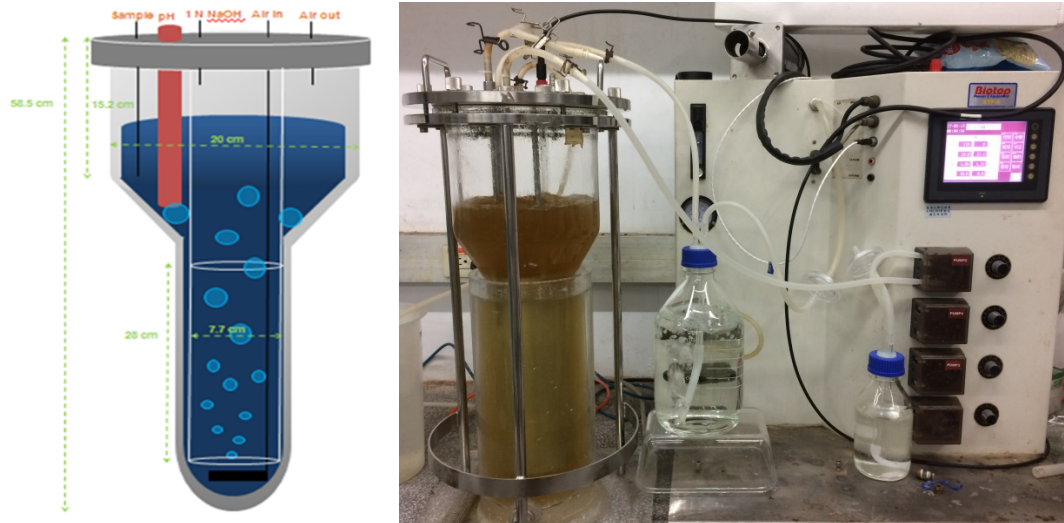


圖 3-5 5 L 氣舉式發酵槽裝置圖

第四章 結果與討論

4.1 細胞突變發酵程序

本實驗所選用的菌種 *M. isabellina* 為高油脂真菌，在 *M. isabellina* 所累積的油脂中不飽和脂肪酸所佔之含量高，其中含有高價值脂肪酸： γ -亞麻酸。進行細胞突變程序可以篩選出 γ -亞麻酸含量高的菌落，並將此菌落製作菌種保存，作為後續之研究及實驗使用。

4.1.1 以 NTG 進行細胞突變

NTG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 為化學誘變劑，已被廣泛用於誘導突變細菌和酵母，其可導致生物體發生基因的突變。本實驗是利用化學誘變劑 NTG 將原始菌種 *M. isabellina* 進行突變處理，探討 NTG 是否可以突變出較高 γ -亞麻酸含量之菌落。實驗結果如下圖，由圖 4-1 可得知大多數菌落之 GLA/Biomass 為 30 mg/L~40 mg/L，而其中 γ -亞麻酸含量最高之菌落為 108 mg/L。另外由圖 4-2 可發現大多數菌落之菌體濃度為 2.0 g/L 左右，而其中最高為 5.35 g/L。因本實驗目的為篩選出 γ -亞麻酸含量最高之菌落，故挑選 γ -亞麻酸含量為 108 mg/L 之菌落，而非 Biomass 最高之菌落。

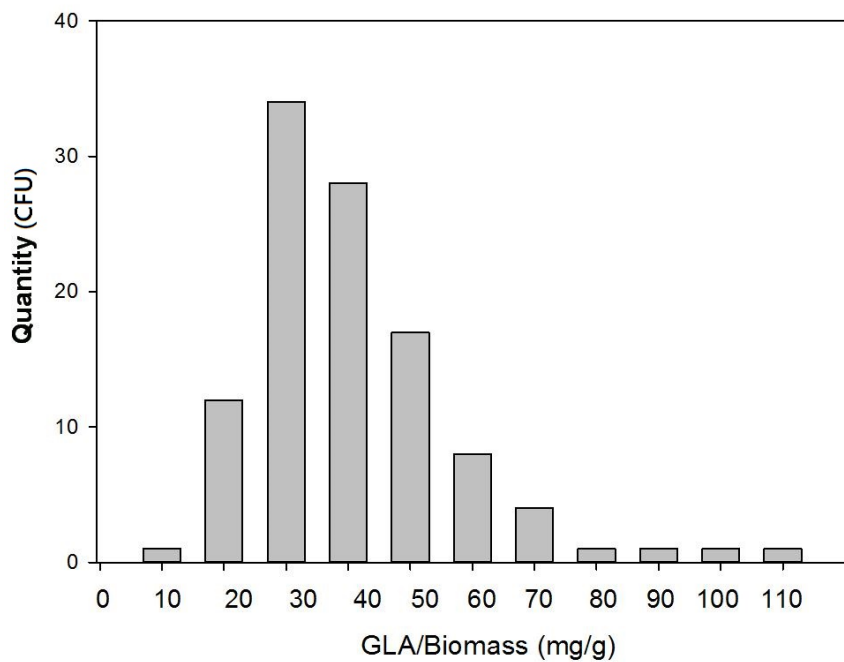


圖 4-1 突變後不同 γ -亞麻酸含量之菌落數目

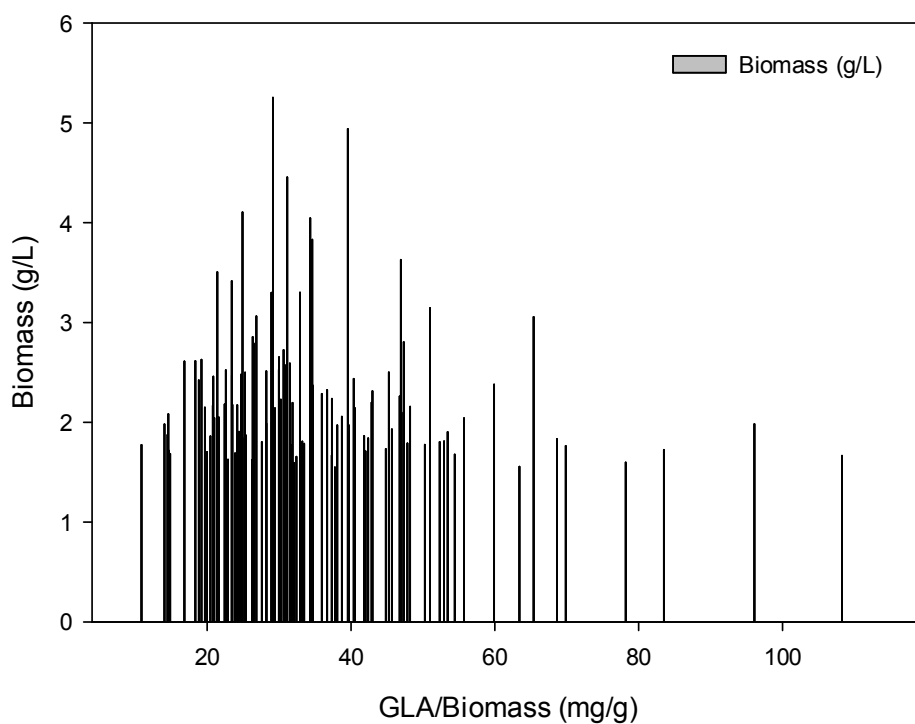


圖 4-2 突變後不同 γ -亞麻酸含量菌落之 Biomass 比較

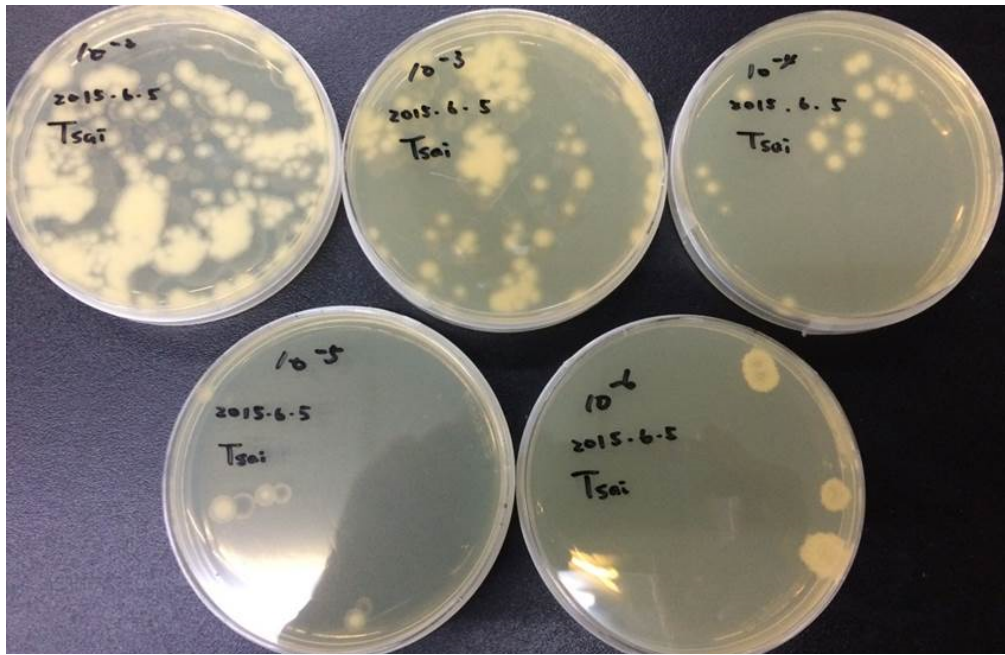


圖 4-3 不同稀釋倍率時 *M. isabellina* 於 Agar plate 上之生長情形

4.1.2 菌體培養時間之影響

本實驗為探討 *M. isabellina* 在不同時間下其 γ -亞麻酸累積之情形，培養方式為液態搖瓶發酵之 Time course 程序。實驗結果如圖 4-4，*M. isabellina* 在前 72 hr γ -亞麻酸對菌體成長呈正比累積；在 96 hr 時 γ -亞麻酸下降至低點，推測 72 hr 碳源及養分消耗完畢所以開始消耗菌體內脂肪酸作為養分；而 96 hr 後菌體開始老化， γ -亞麻酸屬於次級代謝物，故開始累積脂肪酸；老化至 120 hr 後菌體生長趨於平緩， γ -亞麻酸之累積也無增加，72 hr 時 γ -亞麻酸累積量為 32.5 mg/L，GLA/Biomass 為 6.2 mg/g。由實驗結果得知以菌體老化時期累積 γ -亞麻酸為目的之實驗，*M. isabellina* 的培養時間為 120 hr 較為合適。

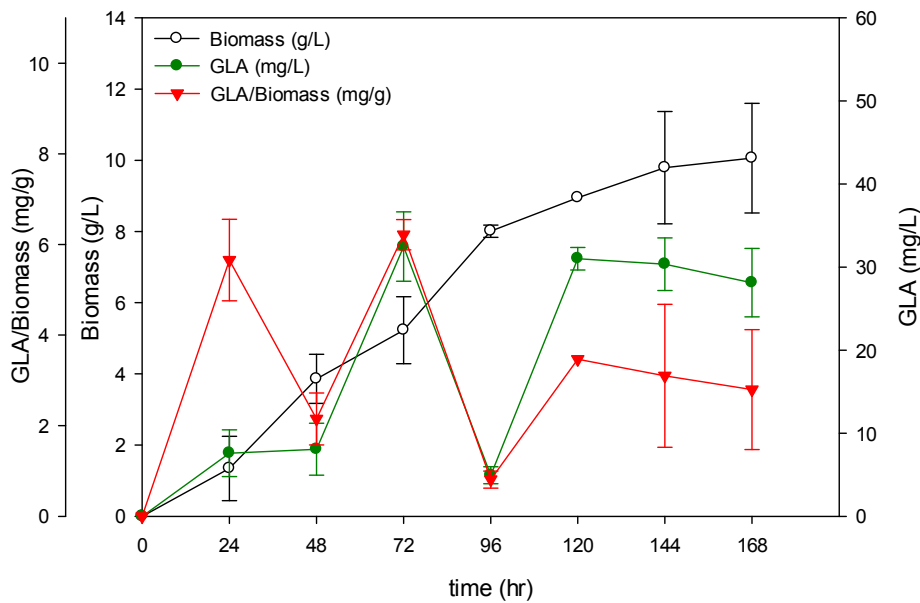


圖 4-4 菌體培養時間對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

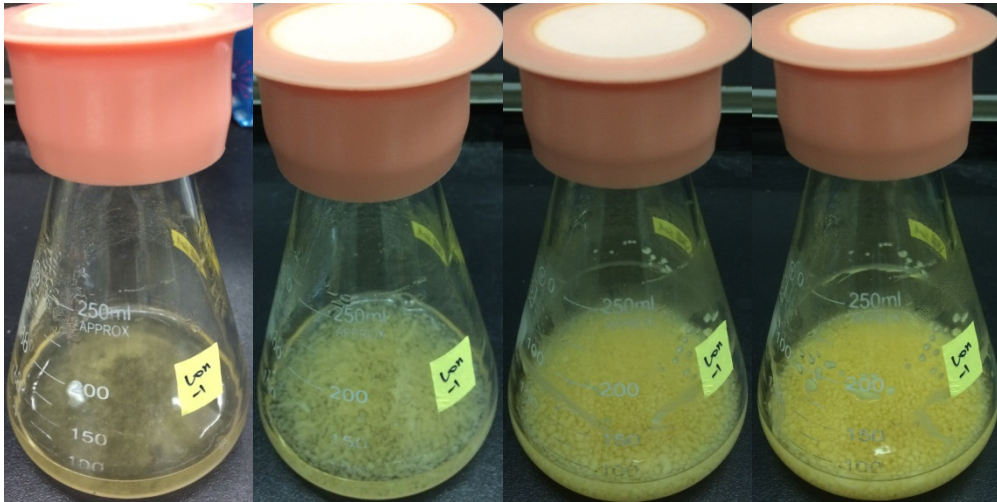


圖 4-5 *M. isabellina* 於搖瓶內進行液態培養 144 hr 之生長情形

4.2 固態搖瓶批次發酵程序

本次所選用的菌種 *M. isabellina* 一直以來被廣泛用於液態發酵，在脂質累積以及 γ -亞麻酸累積方面皆有不錯的表現，由於本實驗目的在於提升 γ -亞麻酸之累積，而 γ -亞麻酸屬於次級代謝物，文獻指出固態發酵程序的生長型態對某些微生物的次級代謝物有正面幫助，並且在後續發酵物的處理上面，固態發酵物通常可以直接被利用，以簡化下游的回收純化過程，並減少廢棄物之問題(Jianguo Zhang et al., 2011)。因此本實驗將探討利用固態發酵培養 *M. isabellina* 對於 γ -亞麻酸累積之影響。

4.2.1 不同含水量之影響

實驗選用玉米作為基質， $\left(\frac{x}{x+\text{基質重}}\right) * 100\% = \text{含水量}\%$ (x 為所添加之水量)，分別改變滅菌前含水量為 40%、50%、60%、70%。而設計實驗時發現含水量在 70% 時，滅菌後之培養基上會十分潮濕，若再將含水量提高，則滅菌後會在培養基上方累積一定水量，故認為含水量 70% 為此實驗之最大值。實驗結果如圖 4-6，發現菌體濃度會隨含水量提高，但 γ -亞麻酸累積並不會隨含水量增加而增加，在含水量為 50% 時為最高，GLA/Sample 為 0.43 mg/g。由實驗推測高含水量有助於菌體生長，使菌體濃度增加，但對 γ -亞麻酸累積沒有影響，GLA/Sample 為 0.38 mg/g ~ 0.43 mg/g。

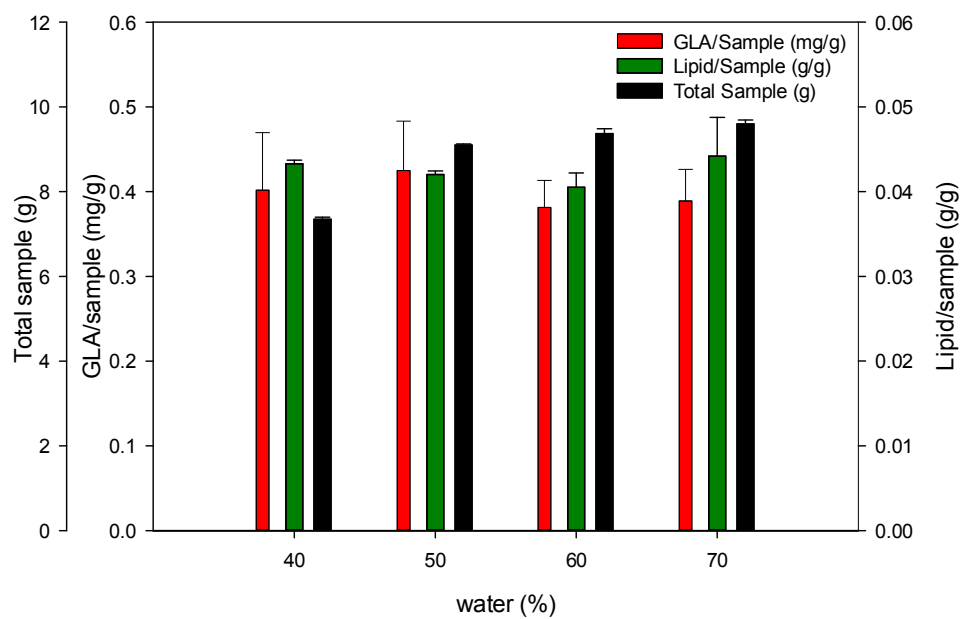


圖 4-6 不同含水量對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

表 4-1 不同含水量對 γ -亞麻酸累積之實驗數據

Water contain (%, w/w)	GLA/Sample (mg/g)	Lipid/Sample (g/g)	Total Sample (g)
40	0.401	0.043	7.349
50	0.425	0.042	9.098
60	0.381	0.041	9.369
70	0.389	0.044	9.596

4.2.2 基質切塊之影響

由不同含水量之實驗中發現，於固態搖瓶培養中 *M. isabellina* 只生長於培養基表面，培養基內部則無菌體生長，浪費了基質表面以外的部分並且限制菌體生長空間。為了使基質其他部分可以被菌體所利用，本次實驗將滅菌後之基質於無菌操作台內進行切塊處理，切塊之示意圖如圖 4-7，而為使切塊後之基質與菌體接觸機會增加，故採取每 12 hr 以人工進行搖晃動作。

實驗結果如圖 4-9，由圖 4-8 可以發現切塊與否有著相當大的差異，切塊後大幅增加了菌體的生長空間，因此可以增加 γ -亞麻酸之累積，切塊後的 GLA/Sample (mg/g) 達到 0.44 mg/g，較切塊前提升了近兩倍。



圖 4-7 基質切塊示意圖

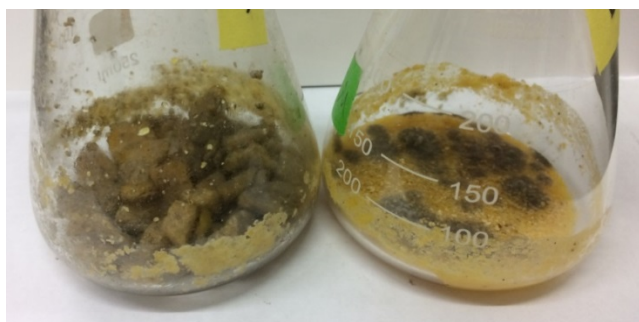


圖 4-8 切塊(左)與不切塊(右)之生長情形

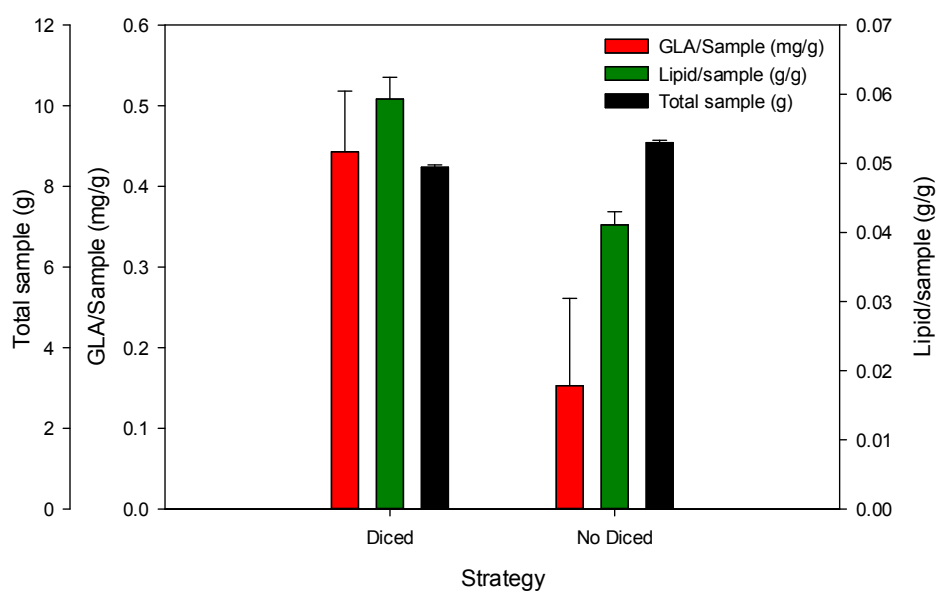


圖 4-9 基質切塊對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

表 4-2 基質切塊對 γ -亞麻酸累積之實驗數據

Strategy	GLA/Sample (mg/g)	Lipid/sample (g/g)	Total sample (g)
Diced	0.443±0.1	0.059	8.476±0.06
No Diced	0.153±0.1	0.041	9.087±0.06

4.3 液態搖瓶批次發酵程序

4.3.1 添加 tween8 之影響

根據文獻指出，添加界面活性劑可有效增加菌體之生長(Xu et al., 2014)，因此推測添加界面活性劑亦可提升 γ -亞麻酸之累積。本次實驗參考前人所做出之結果，選用界面活性劑 tween80(廖于婷, 2015)。本次實驗中界面活性劑的添加量分別為 0 g/L、0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L，實驗結果如圖 4-10，當添加界面活性劑時，菌體濃度會上升，但添加後菌體濃度皆維持在 18.6 g/L 左右；添加界面活性劑後 GLA/Biomass 無明顯增加，為 1.0 mg/g ~ 1.1 mg/g。由實驗結果得知添加界面活性劑後菌體濃度會上升，但菌體濃度與添加濃度無關，而添加界面活性劑則對 γ -亞麻酸之累積無影響。當添加界面活性劑之濃度為 0.5 g/L 時， γ -亞麻酸累積量為 20.89 mg/L，GLA/Biomass 為 1.13 mg/g；當添加量為 1.5 g/L 時 Biomass 為 18.05 g/L，較添加前提升了 29 %。

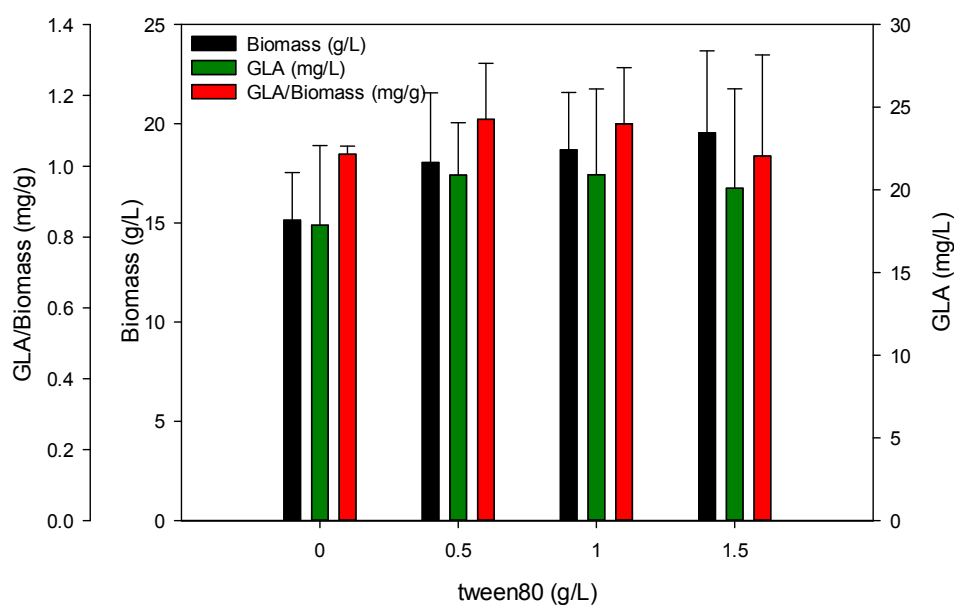


圖 4-10 添加界面活性劑 tween80 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

表 4-3 添加界面活性劑 tween80 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之實驗數據

tween80 (g/L)	Biomass (g/L)	GLA (mg/L)	GLA/Biomass (mg/g)
0	15.14±2.5	17.86±4.8	1.04±0.02
0.5	18.05±3.5	20.89±3.17	1.13±0.16
1.0	18.68±2.9	20.92±5.19	1.12±0.35
1.5	19.54±4.1	20.10±6.01	1.03±0.29

4.3.2 添加植物油之影響

根據文獻指出，在菌體發酵期間添加少量脂肪酸或植物油，可刺激菌絲體生長及增加代謝物的產量。添加 1 % 葵花油於培養基中有助於 *G.lucidum*-二次代謝物的生成，可將多糖含量自 0.13 mg/ml 提升至 0.18 mg/ml (Yang et al., 2000)；利用 *Streptomyces fradiae* 生產 Tylosin，發現以油脂作為碳源有助於提升菌量和 Tylosin 濃度 (Choi et al., 1996)。故油脂中所含脂肪酸對於菌量或者提升二次代謝物有其正面效益。植物油內的脂肪酸經代謝後可得乙烯輔酶 A，菌體藉由乙烯輔酶 A 進入代謝路徑合成次級代謝物。因此本實驗添加富含脂肪酸之植物油作為誘導劑，促使菌體提高 γ -亞麻酸的產量。

I. 不同植物油之影響

本次實驗於培養基中添加市面上常見的五種油類(葵花油、芥花油、米糠油、軟棕櫚油、大豆沙拉油)，其脂肪酸組成如表 4-7，添加濃度固定為 10 %。實驗結果如圖 4-11，可發現植物油添加對於菌體濃度以及 γ -亞麻酸皆有正面之效益，其中菌體濃度表現最好為大豆油，達 17.8 g/L，相對於控制組提高了 33 %；而 γ -亞麻酸累積量表現最好為葵花油，達 46.6 g/L，較控制組提高了約 50 %，GLA/Biomass 則為 2.81 mg/g。由實驗結果得知添加植物油後有助菌體濃度增加，但 GLA/Biomass 無明顯提升。各油品的價格如表 4-8，考量後選用了兩者表現皆良好的葵花油做為後續實驗之添加油品。

II. 添加不同比例植物油之影響

由上述實驗發現植物油添加對於菌體濃度以及 γ -亞麻酸皆有正面之效益，因此此次實驗探討不同比例之植物油添加對菌體生長及 γ -亞麻酸累積之影響。本次實驗選用成本不高且於上述實驗表現不錯的葵花油做為實驗油品，並改變葵花油添加比例，分別為 0 %、1 %、5 %、10 %、15 %。實驗結果如圖 4-12，發現菌體濃度隨植物油添加量而增加，當添加量為 15 % 時菌體濃度達 30.2 g/L；添加植物油濃度越高時 γ -亞麻酸增加，但並無隨菌體濃度呈比例增加，GLA/Biomass 相對減少，當植物油添加量為 1 % 時，GLA/Biomass 為 2.2 mg/g，較添加前提升約 46 %。由實驗結果得知添加不同比例植物油對菌體濃度有顯著效果，但添加比例對 γ -亞麻酸累積量並無太大影響，添加後 GLA/Biomass 為 1.8 mg/g ~ 2.2 mg/g。

III. 添加不同比例植物油與 tween80 之影響

由前述實驗結果顯示添加界面活性劑可有效增加菌體濃度之生長，但對 γ -亞麻酸累積量無太大影響，因此本次實驗探討添加不同比例植物油時再加入界面活性劑 tween80 是否能得到更高產量之 γ -亞麻酸。本次實驗選用葵花油做為添加油品，改變葵花油添加比例分別為 0 %、1 %、5 %、10 %，並額外添加界面活性劑 tween80，添加量為 0.5 g/L。實驗結果如圖 4-13，當植物油添加量超過 5 % 時，菌體濃度沒有明顯增長，皆維持在 30 g/L 上下；而 γ -亞麻酸累積量雖略有提高，卻不如未添加 tween80 時之結果。由實驗結果推測為碳氮源比例之因素，因本次實驗為額外添加植物油，tween80 則使植物油更有效被菌體利用，碳氮比較控制組高，根據文獻指出當碳氮比高時，有效使菌體生長，但碳氮比過高則不利於油質累積，影響次級代謝物之生成(Farhila Muhid et al., 2008; Chen et al., 1996)。

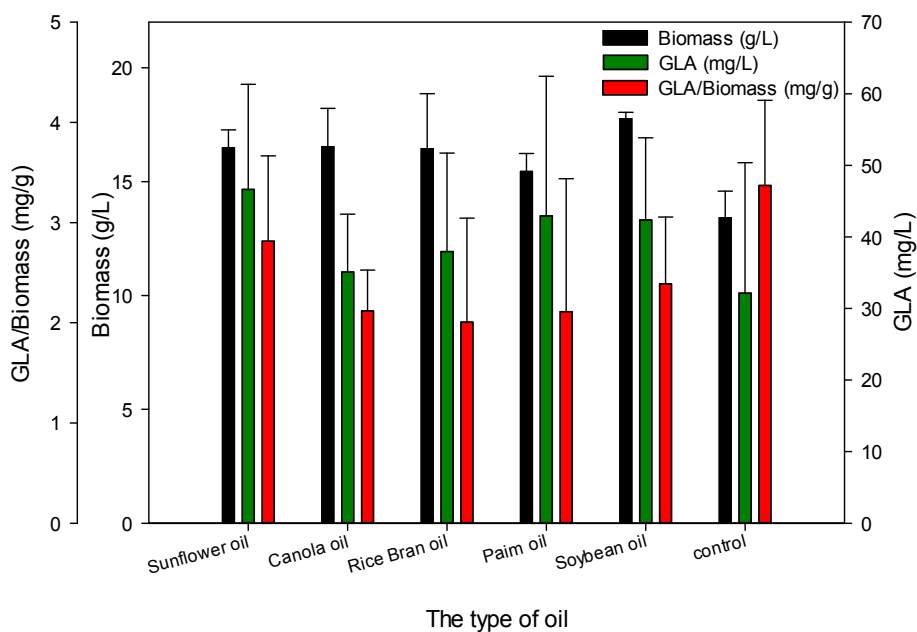


圖 4-11 添加不同植物油對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

表 4-4 添加不同植物油對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之實驗數據

Oil	Biomass (g/L)	GLA (mg/L)	GLA/Biomass (mg/g)
Sunflower oil	16.49±0.8	46.64±14.0	2.81±0.9
Canola oil	16.53±1.7	35.10±8.1	2.12±0.4
Rice Bran oil	16.44±2.4	37.97±13.8	2.01±1.0
Paim oil	15.45±0.8	42.93±19.5	2.11±1.3
Soybean oil	17.76±0.3	42.37±11.5	2.39±0.6
control	13.41±1.2	32.15±18.2	3.38±0.8

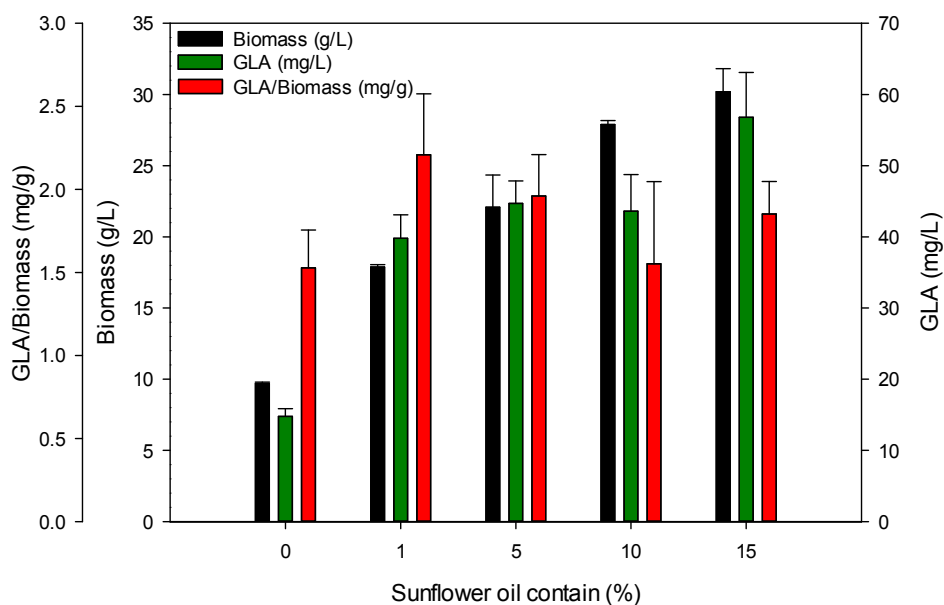


圖 4-12 添加不同比例植物油對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

表 4-5 添加不同比例植物油對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之實驗數據

Oil (%)	Biomass (g/L)	GLA (mg/L)	GLA/Biomass (mg/g)
0	9.70±0.1	14.76±1.1	1.53±0.2
1	17.89±0.2	39.79±3.3	2.20±0.4
5	22.08±2.2	44.69±3.2	1.96±0.3
10	27.89±0.3	43.61±5.1	1.55±0.5
15	30.19±1.6	56.80±6.3	1.85±0.2

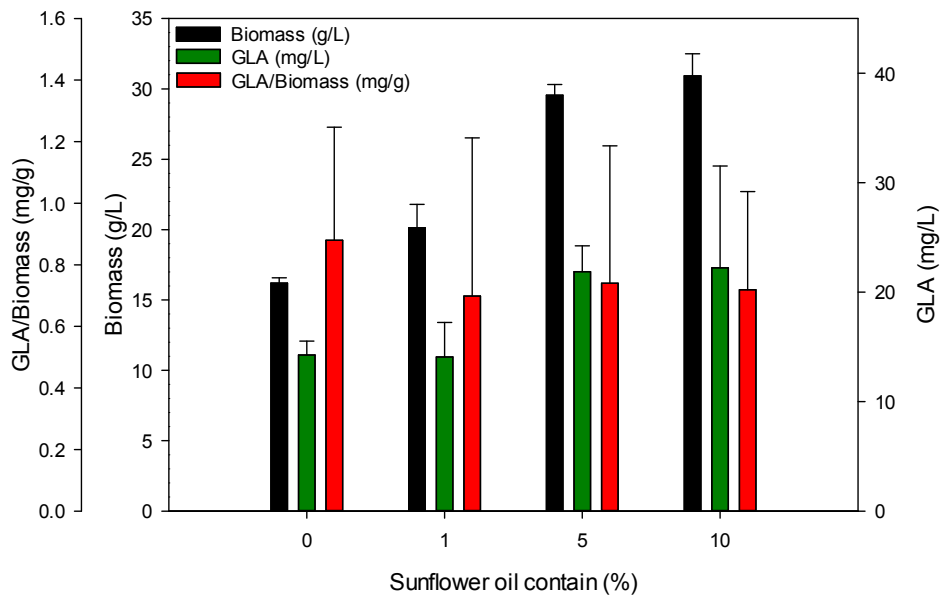


圖 4-13 添加不同比例植物油並加入 tween80 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

表 4-6 添加不同比例植物油並加入 tween80 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之實驗數據

Oil (%)	Biomass (g/L)	GLA (mg/L)	GLA/Biomass (mg/g)
0	16.2040	14.2574	0.8799
1	20.1333	14.0753	0.6982
5	29.5567	21.8813	0.7403
10	30.9267	22.2370	0.7190

表 4-7 各油品脂肪酸組成

油脂種類	Saturated Fatty Acid	Unsaturated Fatty Acid
Sunflower oil (葵花油)	Palmitic Acid (棕櫚酸) 5%	Linoleic Acid (亞油酸) 59%
	Stearic Acid (硬脂酸) 6%	Oleic Acid (油酸) 30%
Canola oil (芥花油)	Palmitic Acid (棕櫚酸) 4%	Linoleic Acid (亞油酸) 21%
	Stearic Acid (硬脂酸) 2%	α -Linoleic Acid (α 亞麻油酸) 9%-11%
		Oleic Acid (油酸) 61%
Rice bran oil (米糠油)	Palmitic Acid (棕櫚酸) 21.5%	Linoleic Acid (亞油酸) 34.4%
	Stearic Acid (硬脂酸) 2.9%	α -Linoleic Acid (α 亞麻油酸) 2.2%
	Myristic Acid (肉豆蔻酸) 0.6%	Oleic Acid (油酸) 38.4%
Palm oil (軟棕櫚油)	Palmitic Acid (棕櫚酸) 43.5%	Linoleic Acid (亞油酸) 9.1%
	Stearic Acid (硬脂酸) 4.3%	Oleic Acid (油酸) 36.6%
	Myristic Acid (肉豆蔻酸) 1%	
Soybean Salad oil (大豆沙拉油)	Palmitic Acid (棕櫚酸) 6-8%	Linolenic Acid (亞油酸) 52%-65%
	Arachidic Acid (花生酸) 0.1%-0.4%	α -Linoleic Acid (α 亞麻油酸) 2%-3%
	Stearic Acid (硬脂酸) 3%-5%	Oleic Acid (油酸) 25%-36%

表 4-8 各油品價格

植物油種類	Price (NTD) for 1L
Sunflower oil (葵花油)	100-120
Canola oil (芥花油)	90-100
Rice bran oil (米糠油)	220-340
Palm oil (軟棕櫚油)	80-100
Soybean Salad oil (大豆沙拉油)	55-75

4.3.3 添加 Hexadecanol 之影響

在液態發酵實驗中，葡萄糖經常被使用作為培養基之碳源。根據文獻指出，若以 hexadecanol 作為碳源使用，*M. isabellina* 可將 hexadecanol 代謝並轉變為 γ -亞麻酸(Mo. Xian et al., 2001)，雖然 Hexadecanol 之價格較高，但添加少量 Hexadecanol 即可達到與添加葡萄糖(60 g/L)培養基相同之菌體濃度與脂肪酸累積量。因此本次實驗將探討以 hexadecanol 作為碳源使用，對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響。

I. 添加不同比例 Hexadecanol 並加入 tween80 之影響

本次實驗於 *M. isabellina* 之發酵過程中，額外添加濃度分別為 1%、1.5%、2% 之 hexadecanol，並加入界面活性劑 tween80，濃度為 0.5 g/L。實驗結果如圖 4-14，當 hexadecanol 之添加量為 1.5% 時，菌體濃度為 28.5 g/L；當添加量為 2% 時，菌體濃度沒有上升，推測為培養基中碳源過剩，菌體濃度已趨近於液態搖瓶培養之最大菌體濃度。根據實驗結果， γ -亞麻酸會隨 hexadecanol 添加量而上升，當添加量為 2% 時， γ -亞麻酸達到 34.17 mg/L，而 GLA/Biomass 則為 1.26 mg/g。證實 hexadecanol 可於發酵過程中，被菌體代謝為脂肪酸，與文獻相符(M. Xian et al., 2001)。

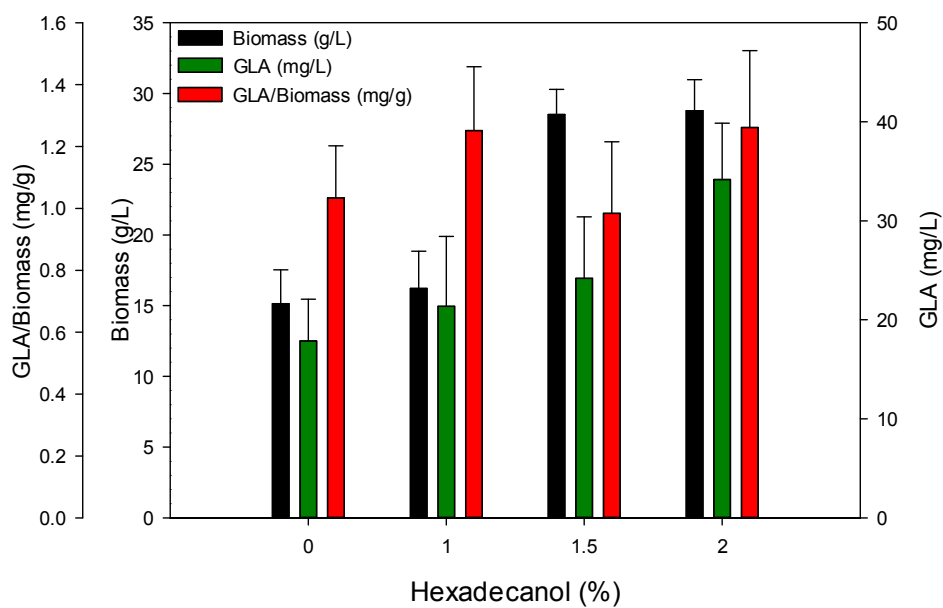


圖 4-14 添加不同比例 Hexadecanol 並加入 tween80 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

表 4-9 添加不同比例 Hexadecanol 並加入 tween80 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之實驗數據

Hexadecanol (%)	Biomass (g/L)	GLA (mg/L)	GLA/Biomass (mg/g)
0.	15.14±2.4	17.86±4.2	1.03±0.2
1.0	16.23±2.6	21.36±7.1	1.25±0.2
1.5	28.51±1.8	24.20±6.2	0.98±0.2
2.0	28.78±2.1	34.17±5.7	1.26±0.2

II. 以 Hexadecanol 取代 Glucose 之影響

由上述實驗得知 hexadecanol 可於發酵過程中，被菌體代謝為脂肪酸，因此本實驗探討若將 hexadecanol 取代葡萄糖作為培養基之碳源，對 γ -亞麻酸累積量之影響。本次實驗於培養基中分別添加濃度為 1.5 %、2.0 %、2.5 %、3.0 % 之 hexadecanol 作為碳源，並與添加濃度為 60 g/L 的葡萄糖相比較。實驗結果如圖 4-15，當 hexadecanol 取代葡萄糖作為碳源後，菌體濃度降低，但 γ -亞麻酸累積量提升，當 hexadecanol 添加量為 2 % 時， γ -亞麻酸達到 45.2 mg/L，為控制組的 2.5 倍；而 GLA/Biomass 為 3.49 mg/g，是控制組的 3.4 倍。當 hexadecanol 添加量為 3 % 時，可達到與控制組差不多之菌體濃度，GLA/Biomass 為 2.99 mg/g。由結果推測當添加量為 2 % 時，培養時間 120 小時，剛好為菌體老化時間，有利於累積次級代謝物。

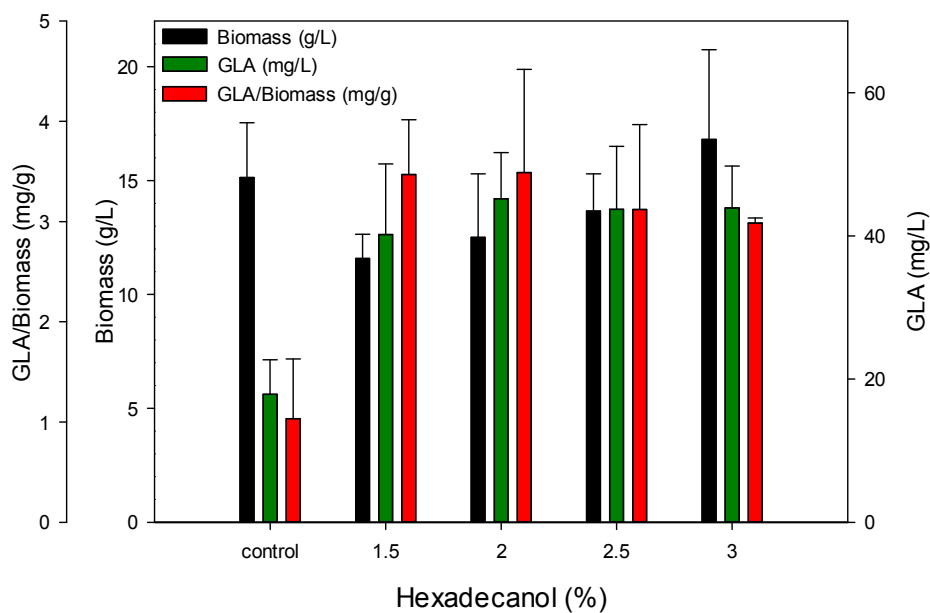


圖 4-15 以 Hexadecanol 取代 Glucose 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

表 4-10 以 Hexadecanol 取代 Glucose 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之實驗數據

Hexadecanol (%)	Biomass (g/L)	GLA (mg/L)	GLA/Biomass (mg/g)
control	15.14±2.4	17.86±4.8	1.03±0.6
1.5	11.58±1.1	40.19±9.9	3.47±0.5
2.0	12.51±2.8	45.20±6.4	3.49±1.0
2.5	13.67±1.6	43.70±8.8	3.12±0.8
3.0	16.81±3.9	43.91±5.8	2.99±0.1

4.3.4 兩階段溫度變化之影響

根據文獻指出，溫度會改變影響細胞膜的流動性，隨著溫度的變化，脂肪酸的分布也會隨之變化，低溫時趨於形成不飽和脂肪，以維持膜功能。因此本次實驗建立兩階段溫度變化之發酵策略，前期先以 25°C 培養 120 小時，使 *M. isabellina* 在前期生長並增加菌體濃度；後期將培養溫度降低至 8°C 並培養 96 小時，使菌體在後期老化並在低溫環境有效累積 γ -亞麻酸。實驗結果如圖 4-16，老化時期 120 hr ~ 168 hr 內， γ -亞麻酸累積量隨時間上升，在 168 hr 時 γ -亞麻酸達到 42.81 mg/L，為 120 hr 時的 2.3 倍，而 GLA/Biomass 為 3.88 mg/g，為 120 hr 的 1.26 倍；在 168 hr 之後，菌體濃度持平，但 γ -亞麻酸累積量迅速下降，推測菌體在 168 hr 之後又將 γ -亞麻酸轉換為其他代謝物。由實驗結果得知，在液態搖瓶發酵策略中，在 120 hr 之後以低溫繼續培養，老化至 168 hr 可得較高的 γ -亞麻酸累積量及 GLA/Biomass。

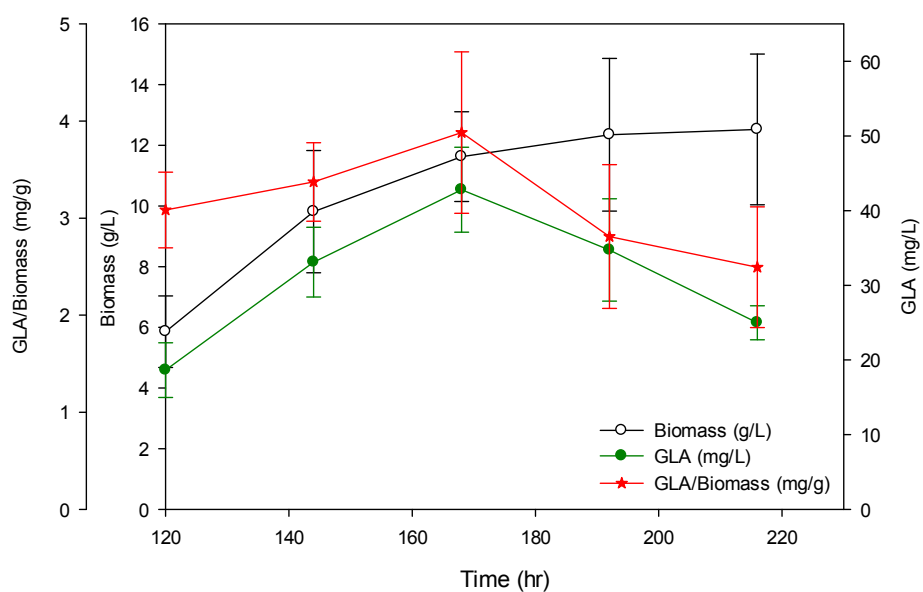


圖 4-16 兩階段溫度變化對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

表 4-11 兩階段溫度變化對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之實驗數據

Time (hr)	Biomass (g/L)	GLA (mg/L)	GLA/Biomass (mg/g)
120	5.85±0.2	18.64±3.7	3.08±0.4
144	9.82±2.0	33.11±4.7	3.37±0.4
168	11.63±1.5	42.81±5.6	3.88±0.8
192	12.35±2.5	34.74±6.9	2.81±0.7
216	12.52±4.5	24.98±2.3	2.49±0.6

4.4 5 L 發酵槽批次發酵程序

為了能有效提升 *M. isabellina* 之菌體濃度與 γ -亞麻酸累積，因此從搖瓶發酵放大至 5 L 攪拌式發酵槽與 5 L 氣舉式發酵槽內批次發酵，並改變其生長環境因子，藉由控制 pH 來維持菌體生長速率與 γ -亞麻酸累積速率，藉以達到 γ -亞麻酸之最高累積量。

4.4.1 攪拌式發酵槽與氣舉式發酵槽之比較

M. isabellina 之適合生長環境為 pH 6.0，搖瓶發酵策略無法有效控制 pH，因此本次實驗藉由放大培養並控制 pH 以達到更高的 γ -亞麻酸累積量與累積速率。本實驗分別將種子培養基接種至 5 L 攪拌式發酵槽與 5 L 氣舉式發酵槽，並將兩者進行比較，其中 5 L 發酵槽通氣量為 1.5 vvm，5 L 攪拌式發酵槽通氣量為 1.0 vvm，攪拌葉片為六片式葉片。

5 L 攪拌式發酵槽的實驗結果如圖 4-17；5 L 氣舉式發酵槽的實驗結果如圖 4-18。由圖 4-21 菌體濃度比較圖發現，攪拌式發酵槽的菌體濃度明顯較氣舉式發酵槽高，推測為攪拌式發酵槽的混合性佳、並有高質傳能力與高剪切力。根據前人的實驗結果(陳昭翰, 2017)得知，若攪拌式發酵槽之轉速過高時，雖有較高的菌體濃度，但轉速高不利於油脂累積。由圖 4-19 及圖 4-20 發現，以氣舉式發酵槽培養之 γ -亞麻酸累積量高於攪拌式發酵槽，且 GLA/Biomass 亦較高，與前人實驗(陳昭翰, 2017)結果相符。當培養 48 hr 時，氣舉式發酵槽之 γ -亞麻酸累積量達到 54.0 mg/L；而 GLA/Biomass 為 10.46 mg/g。由實驗結果發現不論是攪拌式或是氣舉式發酵槽， γ -亞麻酸皆於 48 hr 累積至最高，而後開始下降。與搖瓶發酵實驗相比，放大至 5 L 進行培養之結果較為優秀，而其中以氣舉式發酵槽的 γ -亞麻酸累積量達最高，因此選用 5 L 氣舉式發酵槽作為後續放大實驗用之槽體。

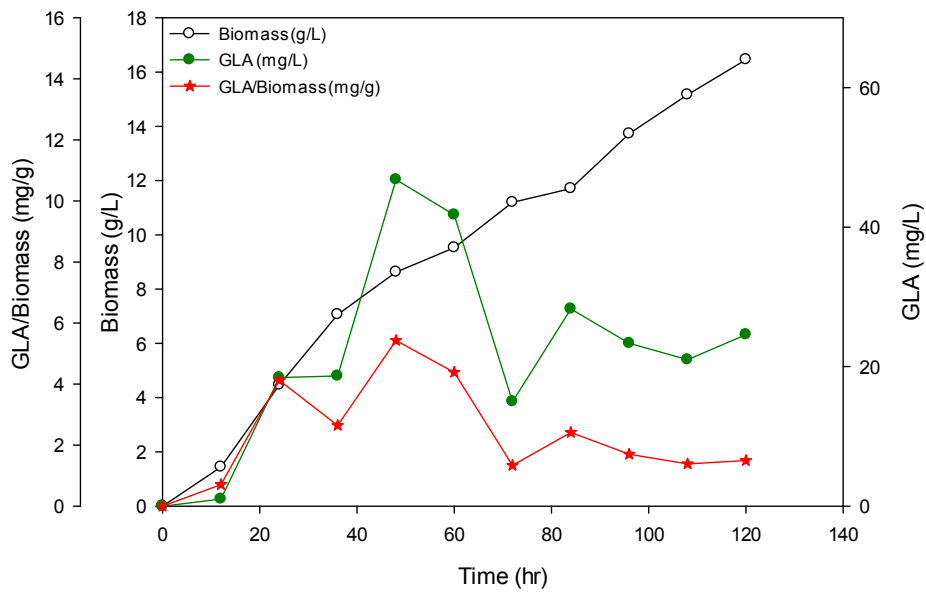


圖 4-17 5 L 攪拌式發酵槽批次發酵對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

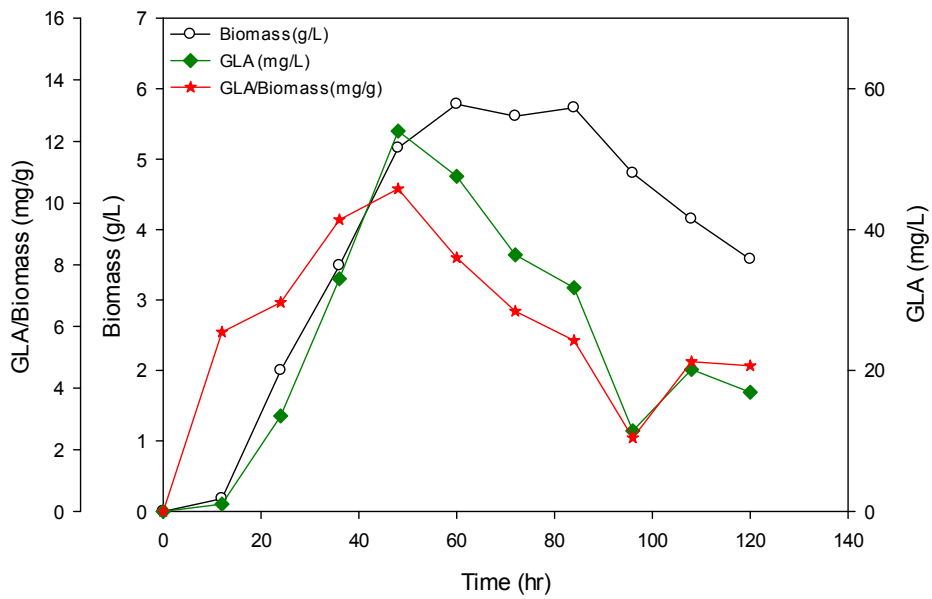


圖 4-18 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

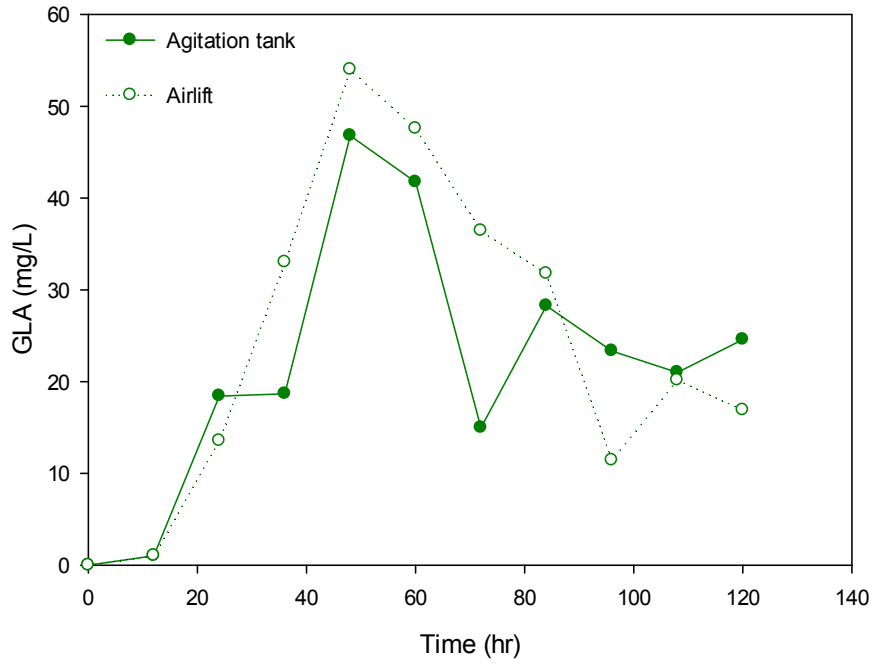


圖 4-19 攪拌式與氣舉式發酵槽之 γ -亞麻酸累積量比較

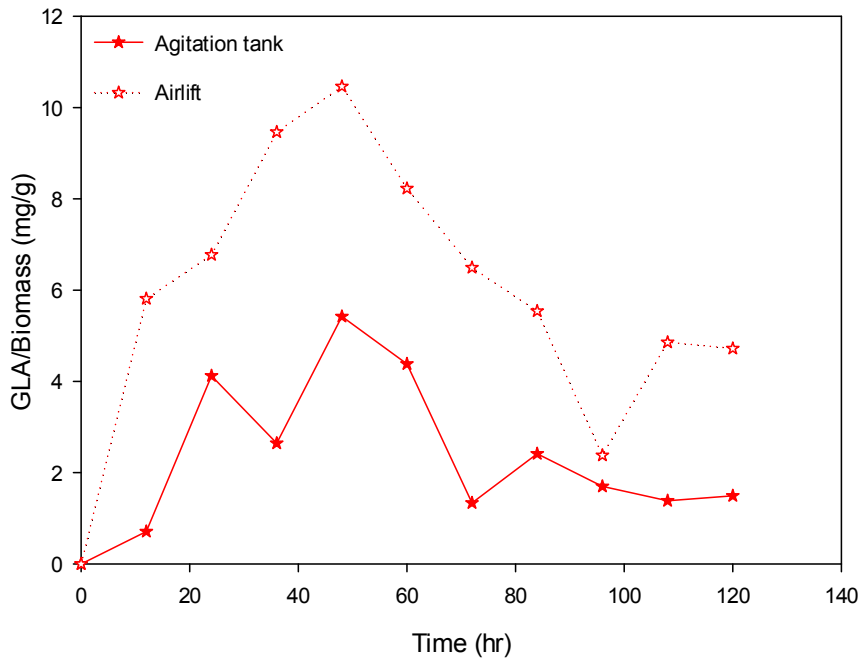


圖 4-20 攪拌式與氣舉式發酵槽之 GLA/Biomass 比較

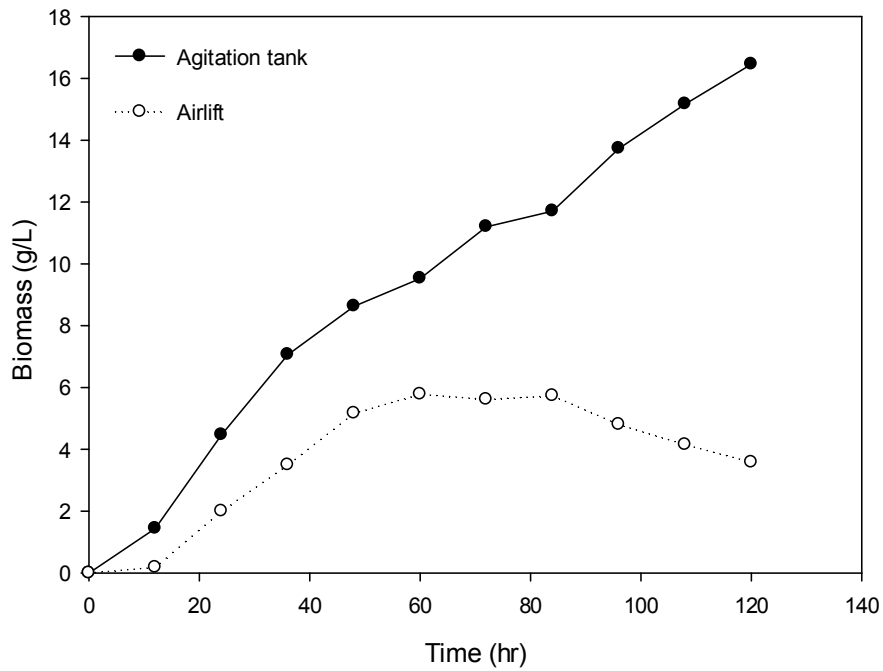


圖 4-21 攪拌式與氣舉式發酵槽之菌體濃度比較

表 4-12 攪拌式發酵與氣舉式批次發酵策略之動力學參數

Fermentation Strategy	Max biomass (g/L)	Max biomass productivity (g/L/h)	Max GLA (mg/L)	Max GLA productivity (mg/L/h)	Max GLA/Biomass (mg/g)	Max GLA/Biomass productivity (mg/g/h)
Agitation tank	16.5	0.17	46.8	2.35	5.4	0.23
Airlift tank	5.78	0.13	54.0	1.75	10.5	0.22



圖 4-22 *M. isabellina* 於 5 L 攪拌式發酵槽內培養 120 hr 之生長情形

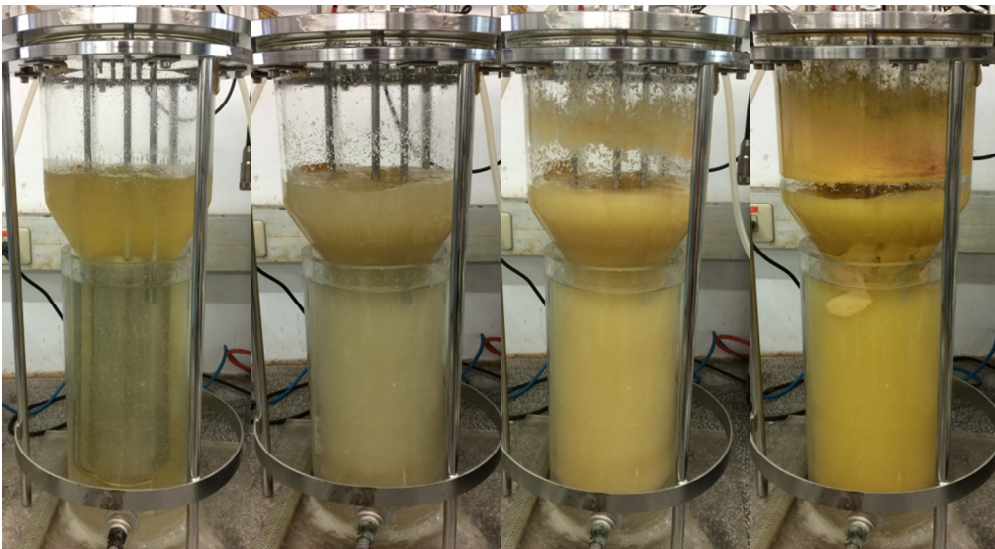


圖 4-23 *M. isabellina* 於 5 L 氣舉式發酵槽內培養 120 hr 之生長情形

4.4.2 改變通氣量之影響

由上述實驗得知氣舉式發酵槽較攪拌式發酵槽能得到更高的 γ -亞麻酸累積量，因此選用氣舉式發酵槽作為後續實驗之發酵設備。根據文獻指出通氣量於發酵過程中對菌體生長有很大的影響，當通氣量越高時菌體濃度則越高。本次實驗將通氣量提升為 2.0 vvm，探討通氣量對 γ -亞麻酸累積之影響。圖 4-24 為通氣量 2.0 vvm 時對菌體生長與 γ -亞麻酸累積量之影響。由 4-27 菌體濃度比較圖之中發現，當通氣量提升為 2.0 vvm 時，菌體濃度明顯上升，菌體生長速度由 0.10 提升為 0.22 g/L/h，在 60 hr 時菌體濃度達到最高，為 13.0 g/L。圖 4-25 與圖 4-26 為 γ -亞麻酸累積量與單位菌體產量比較圖，當提升通氣量為 2.0 vvm 後 γ -亞麻酸累積量沒有提升反而下降，因此通氣量 2.0 vvm 之 GLA/Biomass 亦較通氣量 1.0 vvm 時低。由實驗結果得知，增加通氣量對菌體濃度之提升有明顯幫助，但影響次級代謝物之形成，不利於 γ -亞麻酸累積。

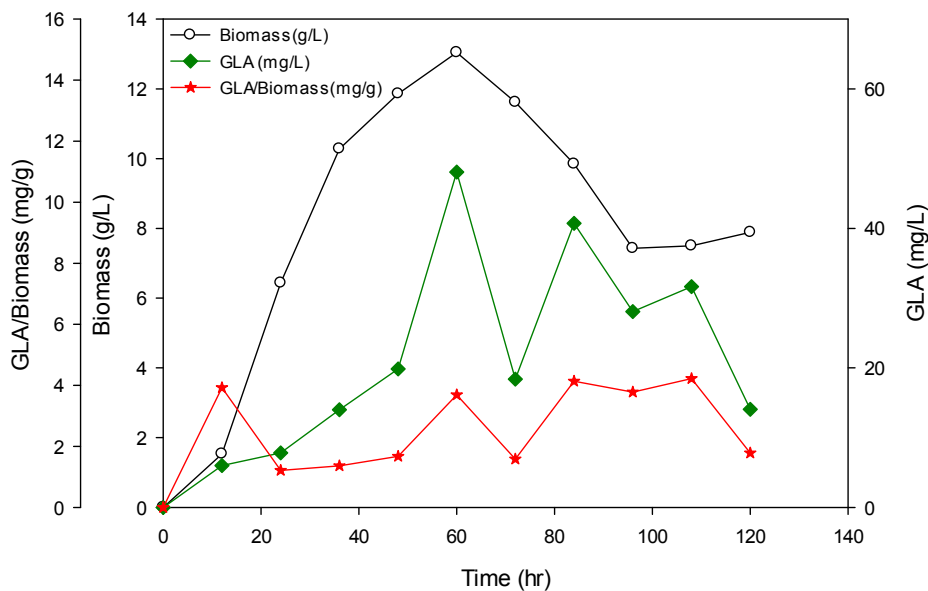


圖 4-24 通氣量 2 vvm 時菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

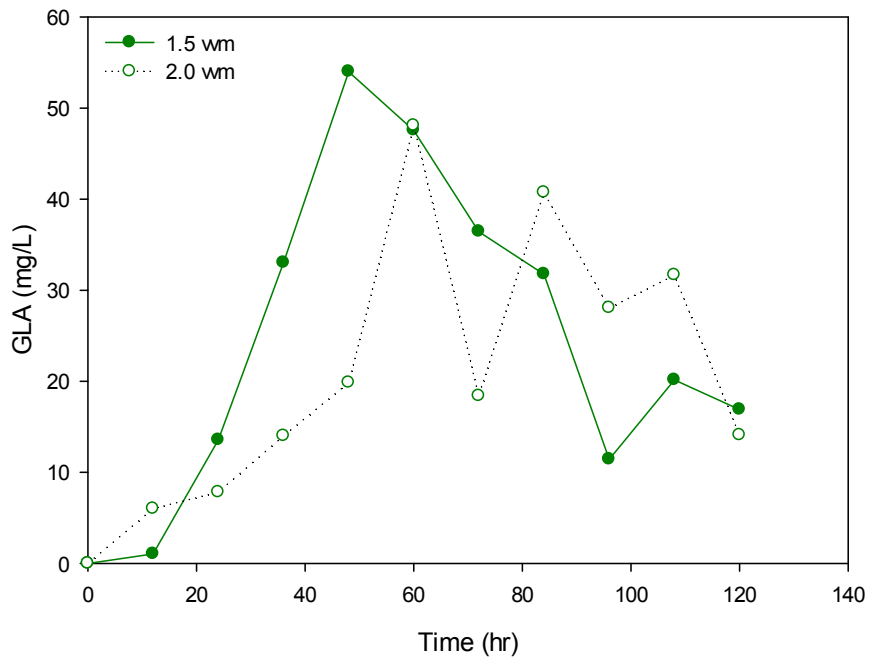


圖 4-25 不同通氣量之 γ -亞麻酸累積量比較

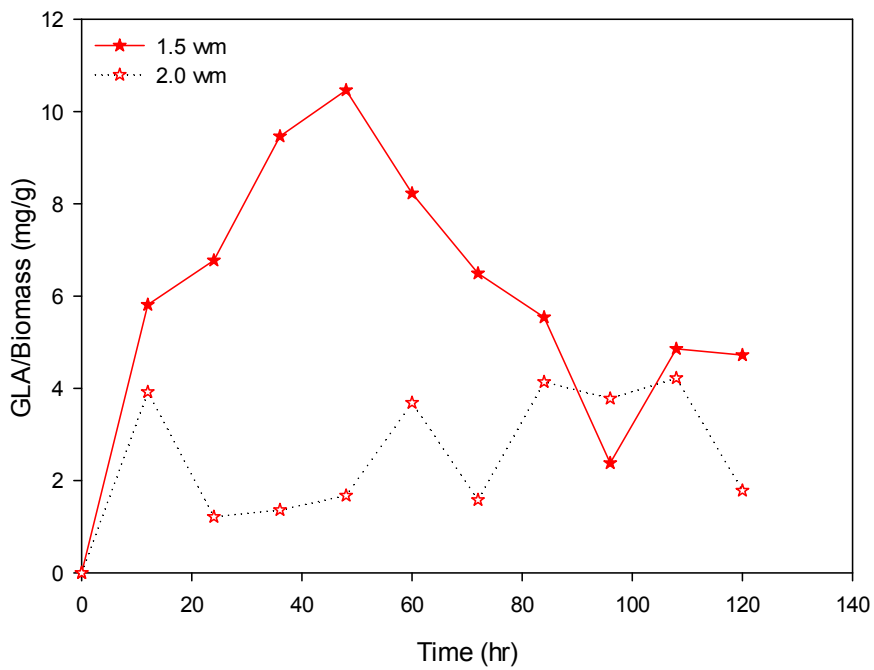


圖 4-26 不同通氣量之 GLA/Biomass 比較

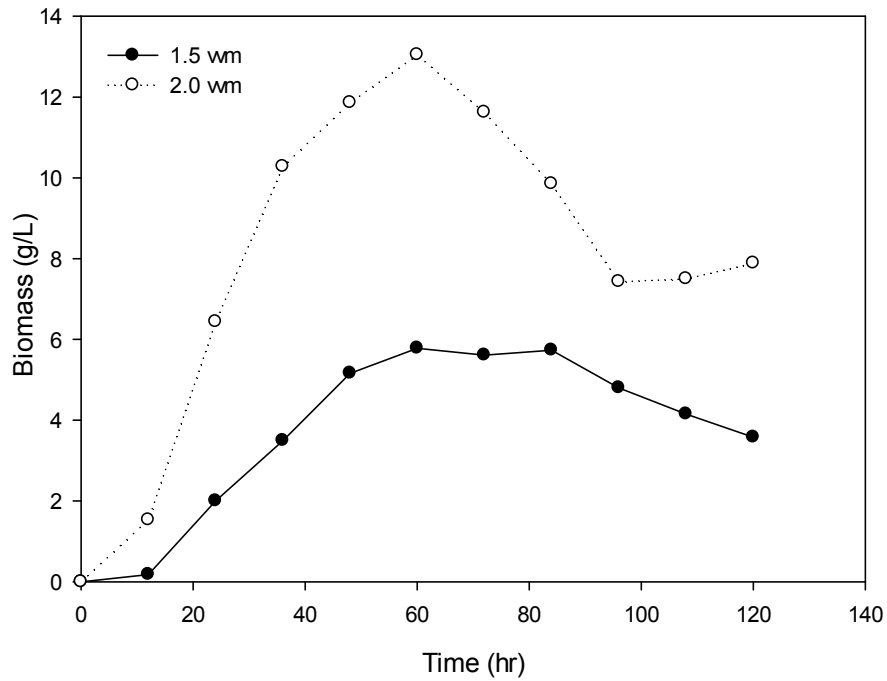


圖 4-27 不同通氣量之菌體濃度比較

表 4-13 不同通氣量批次發酵策略之動力學參數

Fermentation Strategy	Max biomass (g/L)	Max biomass productivity (g/L/h)	Max GLA (mg/L)	Max GLA productivity (mg/L/h)	Max GLA/Biomass (mg/g)	Max GLA/Biomass productivity (mg/g/h)
1.5 vvm	5.78	0.13	54.0	1.75	10.5	0.22
2.0 vvm	13.04	0.32	48.1	2.35	4.1	0.21

4.4.3 添加 Hexdecanol 之影響

由液態搖瓶實驗得知，若於培養基內添加 hexdecanol，菌體可將 hexdecanol 轉換為脂肪酸。因此本次實驗為探討於培養基內添加 hexdecanol 並放大至 5 L 氣舉式發酵槽內培養，控制培養環境為 pH6.0，觀察菌體生長情形與 γ -亞麻酸累積之影響。

I. 添加 2 %Hexadecanol 之影響

本次實驗於培養基內額外添加 2 %之 hexdecanol，放大至 5 L 氣舉式發酵槽中進行培養。實驗結果如圖 4-28，當額外添加 hexdecanol 後，菌體濃度可達 13.6 g/L，為控制組的 2.4 倍。但 γ -亞麻酸累積情形不如預期，最大累積量為 34.6 mg/L，表現結果較控制組差。因 hexdecanol 為非水溶性之白色固體，推測原因為氣舉式發酵槽將之氣體將 hexdecanol 帶至培養基上層，降低質傳效果。

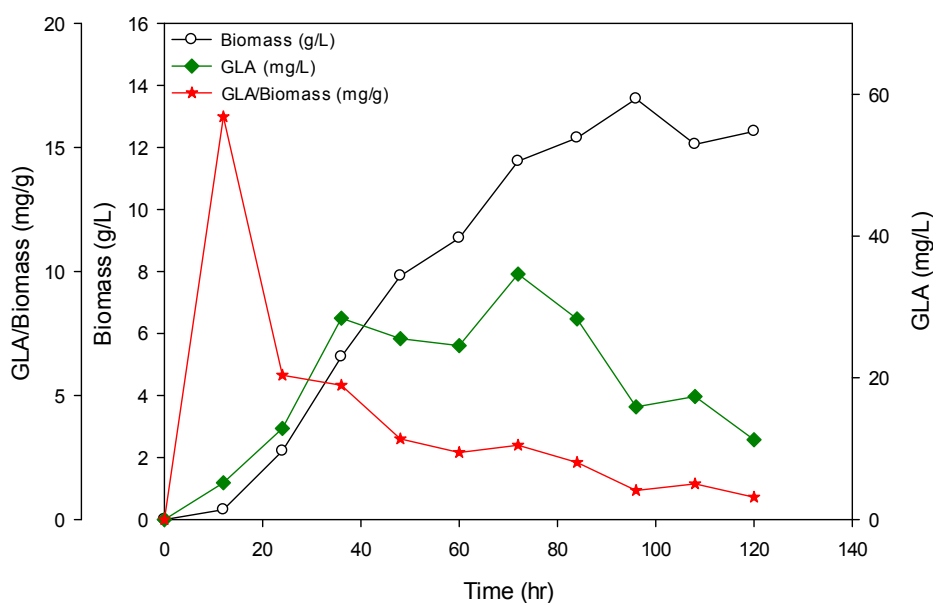


圖 4-28 添加 2 %Hexadecanol 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

II. 添加 2 %Hexadecanol 並加入 tween80 之影響

由上述實驗發現於氣舉式發酵槽內添加 hexadecanol 之表現低於控制組，因此本次實驗於培養基中額外添加 2 %之 hexadecanol，並加入界面活性劑 tween80，以增加質傳效率，放大至 5 L 氣舉式發酵槽中進行培養。實驗結果如圖 4-29，添加 tween80 之後菌體濃度可達 12.7 g/L，為控制組的 2.2 倍，其中菌體生長速度為 0.11 g/L/h； γ -亞麻酸累積量亦明顯增加，在培養 72 hr 時， γ -亞麻酸累積量為 85.7 mg/L，為控制組的 1.6 倍， γ -亞麻酸之累積速率為 1.2 mg/L/h，而 GLA/Biomass 則為 11.5 mg/g。

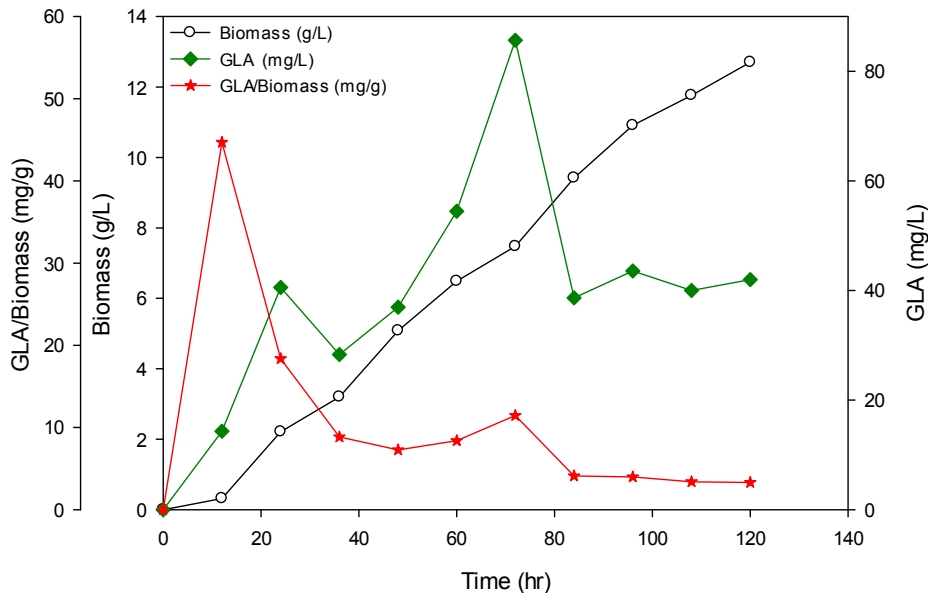


圖 4-29 添加 2 %Hexadecanol 並加入 tween80 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

III. 以 Hexadecanol 取代 Glucose 之影響

由液態搖瓶批次發酵實驗得知，hexadecanol 可以取代葡萄糖作為菌體生長所需之碳源，因此本次實驗探討將 hexadecanol 取代葡萄糖作為培養基之碳源，添加濃度為 2 %，並大至 5 L 氣舉式發酵槽內進行培養，控制 pH 為 6.0，觀察 *M. isabellina* 生長情形與 γ -亞麻酸之累積量影響，並與控制組(添加碳源為 60 g/L 之葡萄糖)做比較。實驗結果如圖 4-30，當培養至 84 hr 時菌體濃度達到 9.5 g/L，而後開始下降， γ -亞麻酸累積量於 72 hr 時達到最高，為 195.2 mg/L；而 GLA/Biomass 亦於 72 hr 時達最最高，為 21.2 mg/g。

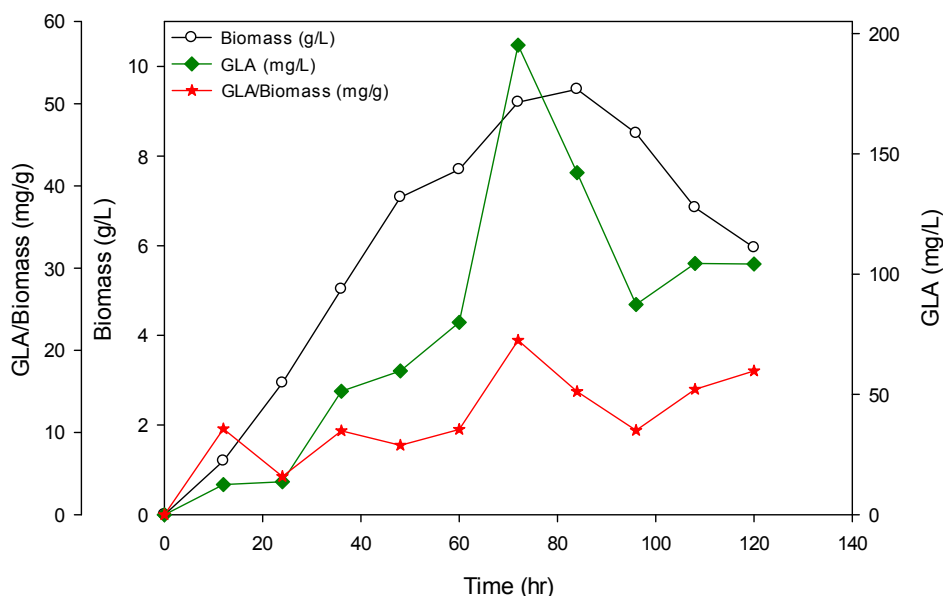


圖 4-30 以 Hexadecanol 取代 Glucose 對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

4.4.3.1 額外添加 Hexadecanol 影響之綜合探討

當額外添加 2 % hexadecanol 並放大至 5 L 氣舉式發酵槽培養時，未添加 tween80 之菌體濃度可達 13.6 g/L，而添加 tween80 後之菌體濃度為 12.7 g/L，皆比控制組提升許多。而 γ -亞麻酸累積量卻有明顯之影響，未添加 tween80 之最大累積量為 34.6 mg/L，較控制組低，推測為氣舉式發酵槽之氣體將非水溶性之 hexadecanol 攜帶至培養基上方造成質傳效果不佳。而添加 tween80 後則可以改善此情形，界面活性劑功能為使目標溶液之表面張力下降，藉此降低液體與固體間的表面張力，並提升溶氧量，有效提升質傳效果，添加 tween80 後 γ -亞麻酸最大累積量為 85.7 mg/L。未添加 tween80 之 GLA/Biomass 較控制組低，為 3.0 mg/g 左右，而添加 tween80 後之 GLA/Biomass 則與控制組相差不多，皆為 8.3 mg/g 上下。結論為額外添加 hexadecanol 並加入界面活性劑 tween80 後對菌體生長有幫助，但 GLA/Biomass 較無影響，推測為碳氮源比例之因素，因本次實驗為額外添加碳源 hexadecanol，碳氮比較控制組高，根據文獻指出當碳氮比高時，有效使菌體生長，但碳氮比過高則不利於油質累積，影響次級代謝物之生成 (Farhila Muhid et al., 2008; Chen et al., 1996)。

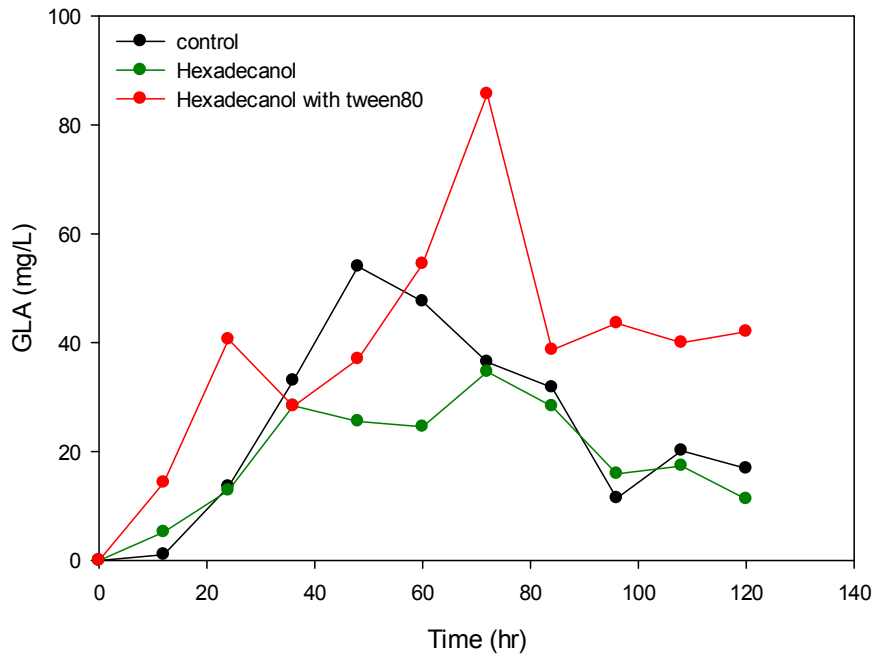


圖 4-31 添加 Hexadecanol 之 γ -亞麻酸累積量比較

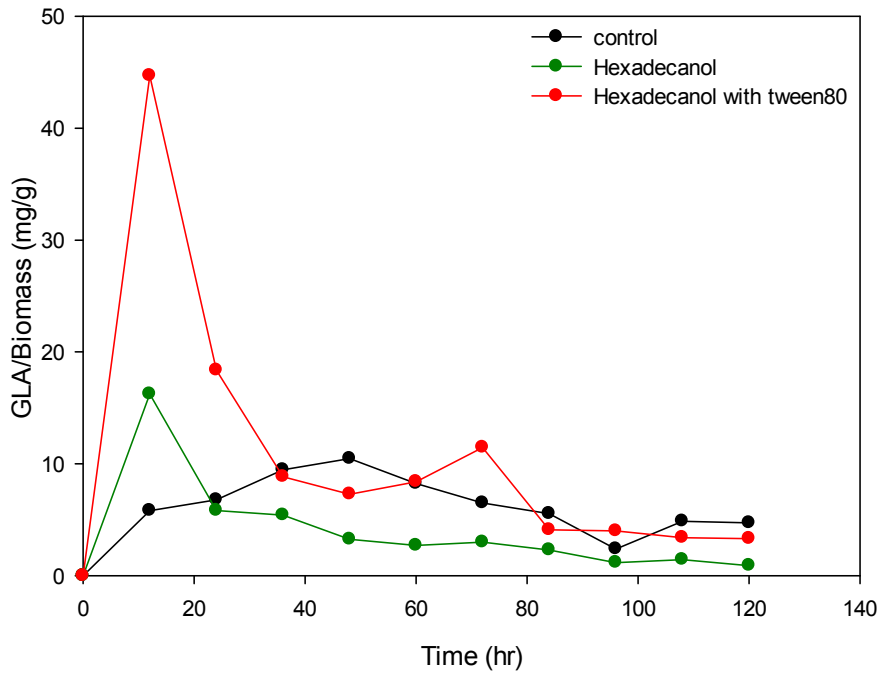


圖 4-32 添加 Hexadecanol 之 GLA/Biomass 比較

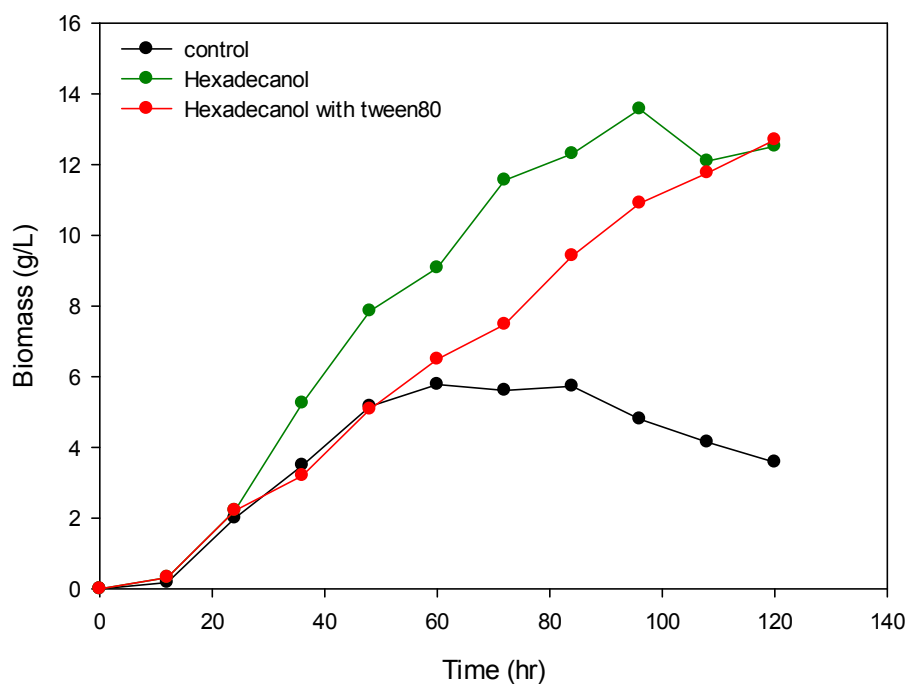


圖 4-33 添加 Hexadecanol 之菌體濃度比較

表 4-14 添加 Hexadecanol 批次發酵策略之動力學參數

Fermentation Strategy	Max biomass (g/L)	Max biomass productivity (g/L/h)	Max GLA (mg/L)	Max GLA productivity (mg/L/h)	Max GLA/Biomass (mg/g)	Max GLA/Biomass productivity (mg/g/h)
control	5.78	0.13	54.0	1.75	10.5	0.22
Hexadecanol	13.57	0.21	34.6	0.84	3.0	0.02
Hexadecanol With tween80	12.70	0.16	85.7	2.60	11.4	0.26

4.4.3.2 以 Hexadecanol 取代 Glucose 之綜合探討

由上述實驗結果得知 *M. isabellina* 可將 hexadecanol 代謝並轉換為脂肪酸儲存，若以 hexadecanol 取代葡萄糖作為培養基碳源，可改善額外添加 hexadecanol 而造成碳氮比過高不利油脂累積之問題。以 hexadecanol 濃度 2 % 培養之結果與葡萄糖濃度 60 g/L 控制組相比，由圖 4-36 發現 hexadecanol 培養之菌體濃度高於控制組，較控制組增加約 64 %。圖 4-34、4-35 中， γ -亞麻酸累積量亦是 hexadecanol 培養結果高於控制組之結果，以 hexadecanol 作為碳源之培養結果有著優異的表現，最大累積量達 195.2 mg/L，為控制組的 3.6 倍；而 GLA/Biomass 亦高於控制組，為控制組的 2 倍。由實驗結果得知若以提升 γ -亞麻酸累積量為實驗目的，使用 hexadecanol 作為碳源培養是可行的，但若考慮成本時，雖 hexadecanol 添加量少於葡萄糖，但 hexadecanol 之價格較葡萄糖高。因此後續實驗則可將發酵策略設計為同時添加不同比例之葡萄糖及 hexadecanol，或是於二階段變溫發酵策略中額外添加少量 hexadecanol 使菌體在老化時期將之轉換為 γ -亞麻酸。

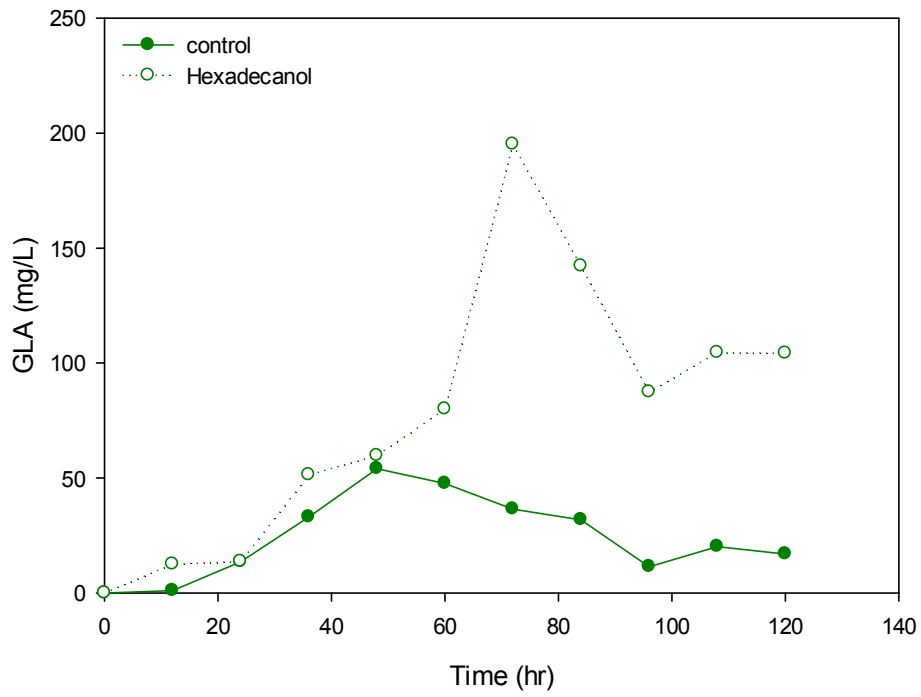


圖 4-34 以 Hexadecanol 取代 Glucose 之 γ -亞麻酸累積量比較

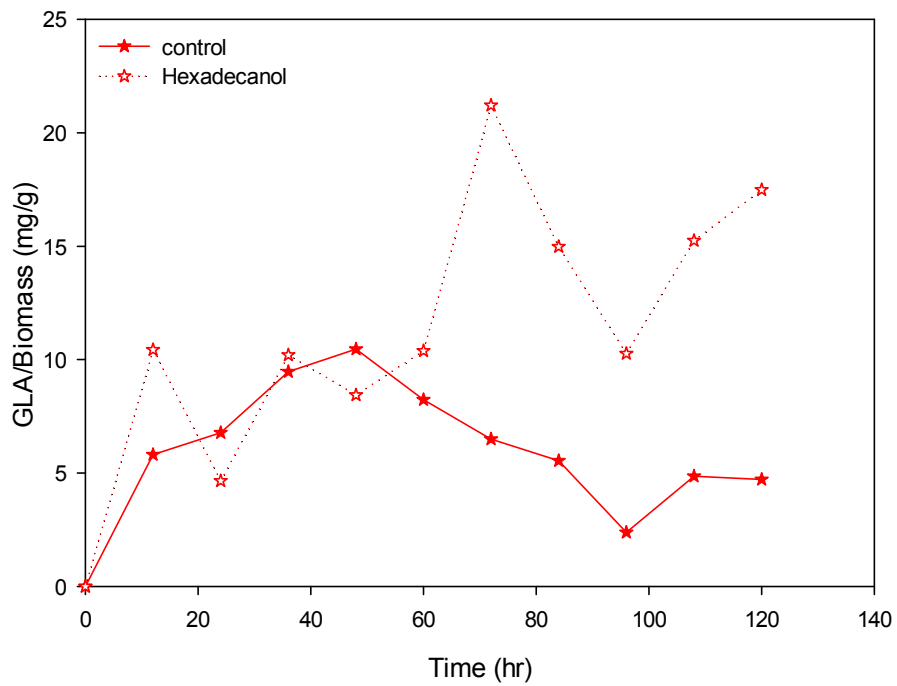


圖 4-35 以 Hexadecanol 取代 Glucose 之 GLA/Biomass 比較

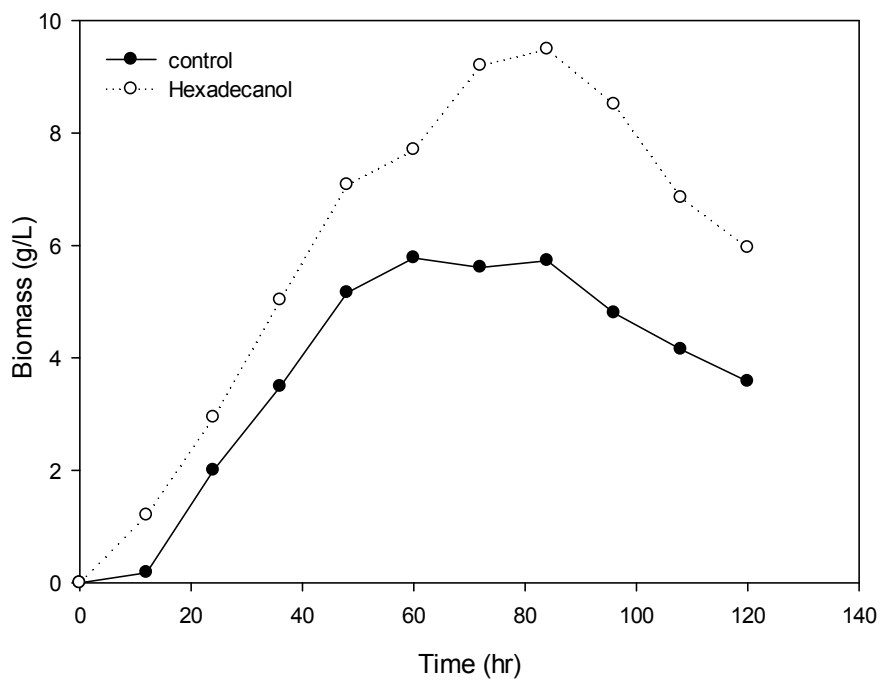


圖 4-36 以 Hexadecanol 取代 Glucose 之菌體濃度比較

表 4-15 以 Hexadecanol 取代 Glucose 批次發酵策略之動力學參數

Fermentation Strategy	Max biomass (g/L)	Max biomass productivity (g/L/h)	Max GLA (mg/L)	Max GLA productivity (mg/L/h)	Max GLA/Biomass (mg/g)	Max GLA/Biomass productivity (mg/g/h)
Control	5.78	0.13	54.0	1.75	10.5	0.22
Hexadecanol	9.49	0.17	195.2	9.61	21.2	0.90

4.4.4 兩階段溫度變化之影響

根據文獻指出，溫度會改變影響細胞膜的流動性，隨著溫度的變化，脂肪酸的分布也會隨之變化，低溫時趨於形成不飽和脂肪，以維持膜功能。由液態搖瓶實驗結果得知兩階段溫度改變之發酵策略對 γ -亞麻酸累積量提升有明顯效果，因此本次實驗使用兩階段溫度變化並放大至 5 L 氣舉式發酵，以通氣量 1.5 vvm 進行培養，並分為兩階段式變溫，第一階段以 24 °C 進行培養，培養至 120 hr 時將溫度降為 8°C 開始第二階段培養。實驗結果如圖 4-37，當培養至 84 hr 時菌體濃度達到最高為 11.4 g/L，其後菌體濃度開始下降，培養時間 120 hr 後菌體濃度持平為 6.8 g/L 上下。第一階段中 γ -亞麻酸於 72 hr 累積最大值，為 66.8 mg/L，而後開始下降，當進入第二階段後 γ -亞麻酸於 144 hr 迅速累積，並在 156 hr 開始持平，約為 107.9 mg/L。而 GLA/Biomass 於 156 hr 達到最高值，為 18.4 mg/g，其後降至 15.5 mg/g 並持平。由實驗結果得知兩階段溫度變化之發酵策略雖無法提高菌體濃度，但可有效增加 γ -亞麻酸累積量，並提升 γ -亞麻酸之單位菌體產量。第二階段的 γ -亞麻酸累積量較第一階段最高點提升 61.5%，而 GLA/Biomass 亦提高約 3 倍。證實以低溫培養有利於次級代謝物合成，增加 γ -亞麻酸累積量。

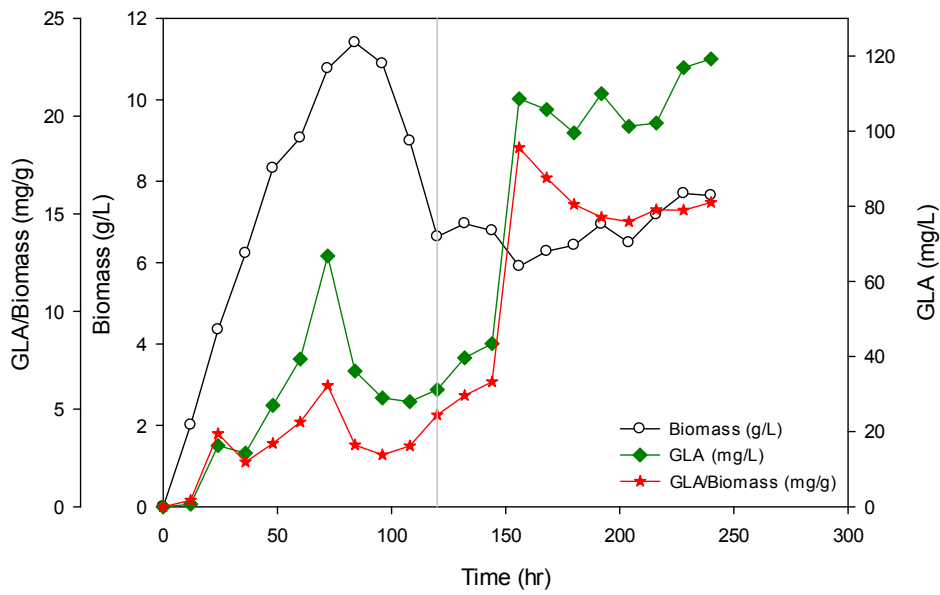


圖 4-37 兩階段溫度變化對菌體生長與 γ -亞麻酸累積之影響

表 4-16 兩階段溫度變化批次發酵策略之動力學參數

Fermentation Strategy	Max biomass (g/L)	Max biomass productivity (g/L/h)	Max GLA (mg/L)	Max GLA productivity (mg/L/h)	Max GLA/Biomass (mg/g)	Max GLA/Biomass productivity (mg/g/h)
First stage 24°C	11.41	0.17	66.8	2.29	6.2	0.16
Second stage 8°C	7.70	0.06	119.2	5.43	18.4	1.00

表 4-17 對於菌體生長與 γ -亞麻酸累積之比較，各發酵槽實驗之動力學參數

Fermentation Strategy	Max biomass (g/L)	Max biomass productivity (g/L/h)	Max GLA (mg/L)	Max GLA productivity (mg/L/h)	Max GLA/Biomass (mg/g)	Max GLA/Biomass productivity (mg/g/h)
Agitation tank	16.5	0.17	46.8	2.35	5.4	0.23
Airlift 1.0 vvm	5.78	0.13	54.0	1.75	10.5	0.22
Airlift 2.0 vvm	13.04	0.32	48.1	2.35	4.1	0.21
adding Hexadecanol	13.57	0.21	34.6	0.84	3.0	0.02
adding Hexadecanol and tween80	12.70	0.16	85.7	2.60	11.4	0.26
replace Glucose with Hexadecanol	9.49	0.17	195.2	9.61	21.2	0.90
Two – stage temperature	7.70	0.06	119.2	5.43	18.4	1.00

表 4-18 提升 γ -亞麻酸累積之搖瓶實驗與文獻之比較

Stain	Fermentation strategy feeding volumn	Carbon source	Biomass (g/L)	GLA (mg/L)	GLA/Biomass (mg/g)	Reference
<i>M. isabellina</i> ATHUM2935	Batch 50 ml two-stage Temp.	Xylose	5.5	127	23.1	(Fakas et al., 2009)
<i>M. isabellina</i> XM-3	Batch 50 ml disrupted cell	Glucose	10.5	260	24.7	(Xian et al., 2003)
<i>M. isabellina</i> XM-3	Batch 50 ml two-stage Temp.	Glucose & Hexadecanol	13.0	320	24.6	(Xian et al., 2002)
<i>M. isabellina</i> XM-3	Batch 50 ml	Glucose & Octadecanol	32	80	2.5	(Xian et al., 2002)
<i>M. isabellina</i> BCRC31721	Batch 50 ml	Glucose & Oil	17.9	39.8	2.2	This study
<i>M. isabellina</i> BCRC31721	Batch 50 ml	Glucose & Hexadecanol	12.5	45.2	3.5	This study
<i>M. isabellina</i> BCRC31721	Batch 50 ml two-stage Temp.	Glucose	11.6	42.8	3.9	This study

表 4-19 提升 γ -亞麻酸累積之發酵槽實驗與文獻之比較

Stain	Fermentation strategy feeding volumn	Aeration (vvm)	Carbon source	Max Biomass (g/L)	Max GLA (mg/L)	Max GLA/Biomass (mg/g)	Reference
<i>M. isabellina</i> Oudem	Batch 5L Airlift	0.5	Glucose	14.0	247.7	17.7	(Hansson et al., 1988)
<i>M. isabellina</i> BCRC31721	Batch 5L Airlift	1.5	Glucose	5.8	54.0	10.5	This study
<i>M. isabellina</i> BCRC31721	Batch 5L Airlift	2.0	Glucose	13.0	48.1	4.1	This study
<i>M. isabellina</i> BCRC31721	Batch 5L Agitation tank	0.5	Glucose	16.5	46.8	5.4	This study
<i>M. isabellina</i> BCRC31721	Batch 5L Airlift	1.5	Glucose & Hexadecanol	12.7	85.7	11.4	This study
<i>M. isabellina</i> BCRC31721	Batch 5L Airlift	1.5	Hexadecanol	9.5	195.2	21.2	This study
<i>M. isabellina</i> BCRC31721	Batch 5L Airlift two-stage Temp.	1.5	Glucose	7.7	119.2	18.4	This study

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

本研究利用 *Mortierella isabellina* 培養，分成三大部分進行討論：(1) 固態液態與放大培養之發酵策略，(2) 添加 Hexadecanol 或以 Hexadecanol 作為培養基之碳源，(3) 兩階段變溫之發酵策略，分別探討對 *M. isabellina* 的生長影響性與 γ -亞麻酸累積量，以下整理列出幾點結論：

1. 由液態搖瓶培養時間得知 *M. isabellina* 約在 72 hr 時 γ -亞麻酸累積量達到最高，隨後開始自行消耗， γ -亞麻酸累積量下降，96 hr 後菌體開始老化，並累積次級代謝物，老化至 120 hr 後 γ -亞麻酸累積量趨於平緩。
2. 固態發酵中改變基質含水量有助於菌體濃度提升，但 γ -亞麻酸累積不會隨含水量而增加，菌體不會生長於基質內部，因此基質切塊與否對菌體生長有很大影響。
3. 液態搖瓶發酵實驗中添加界面活性劑 tweem80 後菌體濃度上升， γ -亞麻酸累積量亦會增加，但 γ -亞麻酸之單位菌體產量不會隨 tweem80 添加濃度而改變。
4. 液態搖瓶發酵實驗中添加不同濃度之植物油後對菌體濃度提升有顯著效果，但對 γ -亞麻酸累積量無太大影響。
5. 5 L 發酵槽實驗中，攪拌式發酵槽之菌體濃度較氣舉式發酵槽高，但 γ -亞麻酸累積量則為氣舉式發酵槽較高，其中氣舉式發酵槽若增加通氣量，有助於增加菌體濃度，但不利於代謝物累積。

6. 液態發酵實驗中添加 hexadecanol，菌體濃度大幅增加， γ -亞麻酸累積量亦增加，菌體可將 hexadecanol 轉換為 γ -亞麻酸並儲存。
7. 液態發酵實驗中若以 hexadecanol 取代葡萄糖作為培養基之碳源，菌體濃度與 γ -亞麻酸累積量大幅增加，但 hexadecanol 之成本較高。
8. 液態發酵實驗中建立兩階段式變溫策略，於菌體老化時期進行低溫培養有利於 γ -亞麻酸累積，可以有效提升 γ -亞麻酸之單位菌體產量。

5.2 未來展望

以 *Mortierella isabellina* 發酵生產 γ -亞麻酸具有很高潛力及很多優點，菌體老化時期以低溫培養可使 γ -亞麻酸大量累積，未來可著重於低溫老化時期之發酵策略：於菌體老化時期添加 hexadecanol、或於培養基內添加兩種碳源：葡萄糖及 hexadecanol 並找出兩種添加碳源之最適比，也許可將 γ -亞麻酸更進一步提高。若將發酵策略改變為重複批次實驗，找出重複批次發酵的最佳條件與重複批次之次數，將可有效縮短單次發酵時間，以達到節省成本並增加產能之目的，相當具有研究之潛力。

參考文獻

莊晟榜(2002)。Tween系列界面活性劑對微生物降解碳氫化合物之影響。中原大學化學工程學系研究所碩士論文。

馮昌宇(2009)。Rhodobacter sphaeroides好氧發酵生成Co-Q₁₀之發酵槽饋料批次策略探討。東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。

張承豪(2013)。台灣產被孢黴屬(*Mortierella*) (Section Hygrophylla and Spinosa) 之分類研究。國立台北教育大學理學院自然科學教育學系研究所論文。

廖于婷(2015)。海水與滅菌策略對於黏紅酵母菌於氣舉式發酵槽中生長之影響性。私立東海大學化學工程暨材料工程學系研究所碩士論文。

蘇國智(2016)。探討固態及液態深層發酵對*Rhodotorula glutinis*生產β-胡蘿蔔素之影響。私立東海大學化學工程暨材料工程學系研究所碩士論文。

陳昭翰(2017)。以*Mortierella isabellina*之微生物油脂生產生質柴油之研究。私立東海大學化學工程暨材料工程學系研究所碩士論文。

Alberto Ascherio, Eric B Rimm, Edward L Giovannucci, Donna Spiegelman, Meir Stampfer, Walter C Willett. 1996. "Dietary Fat and Risk of Coronary Heart Disease in Men: Cohort Follow up Study in the United States." *BMJ (Clinical research ed.)* 313(7049): 84–90.

Carvalho, Patrícia De Oliveira, Joaquim Gilberto De Oliveira, and Gláucia Maria Pastore. 1999. "Enhancement of Gamma-Linolenic Acid Production by the Fungus *Mucor* Sp LB-54 by Growth Temperature." *Revista de Microbiologia*

30(2): 170–75.

Carvalho, Patrícia de Oliveira, Joaquim Gilberto De Oliveira, and Pastore Gláucia Maria. 1992. “Lipid Formation in the Oleaginous Mould *Entomophthora Exitalis* Grown in Continuous Culture: Effects of Growth Rate, Temperature and Dissolved Oxygen Tension on Polyunsaturated Fatty Acids.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 37(1): 18-22.

Chao Peng, He Huang, Xiaojun Ji, Xin Liu, Jiangying You, Jinmiao Lu, Leilei Cong, Xiaokang Xu, Pingkai Ouyang. 2010. “A Temperature-Shift Strategy for Efficient Arachidonic Acid Fermentation by *Mortierella Alpina* in Batch Culture.” *Biochemical Engineering Journal* 53(1): 92–96.

Colin Ratledge. 2004. “Fatty Acid Biosynthesis in Microorganisms Being Used for Single Cell Oil Production.” *Biochimie* 86(11): 807–815.

David S. HIBBETT, Manfred BINDER, Joseph F. BISCHOFF, Meredith BLACKWELL, Paul F. CANNON. 2007. “A Higher-Level Phylogenetic Classification of the Fungi.” *Mycological Research* 111(5): 509–547.

Farhila Muhid, WanNazatul, Naziah WanNawi, and Abdul Jalil AbdulKader. 2008. “Effects of Metal Ion Concentrations on Lipid and Gamma Linolenic Acid Production by *Cunninghamella* Sp. 2A1.” *OnLine Journal of Biological Sciences* 8(3): 62–67.

GENG Qing-wei , WU Kai-yun , WU Xiao-qin , LI Ji-yuan, LIU Ming-jing, PING Xiu-min. 2010. “Preliminary Study on the *Mortierella Isabellina* Fermentating to Produce Lipid.” *Forest Research* 23(3): 336–341.

- G. Venkata Subhash, S. Venkata Mohan. 2011. "Biodiesel Production from Isolated Oleaginous Fungi *Aspergillus* Sp. Using Corncob Waste Liquor as a Substrate." *Bioresource Technology* 102(19): 9286–9290.
- Gustavo Viniegra-González, Ernesto Favela-Torres, Cristobal Noe Aguilar, Sergio de Jesus Romero-Gomez, Gerardo D'iaz-Godinez, Christopher Augur. 2003. "Advantages of Fungal Enzyme Production in Solid State over Liquid Fermentation Systems." *Biochemical Engineering Journal* 13(2–3): 157–167.
- Hung-Chang Chen, Chi-Chia Chang. 1996. "Production of γ -Linolenic Acid by the Fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840." *Biotechnology Progress* 12(3): 338-341.
- Jin, Ming-Jie et al., 2008. "A Novel Two-Step Fermentation Process for Improved Arachidonic Acid Production by *Mortierella Alpina*." *Biotechnol Lett* 30: 1087–1091.
- Kenichi Higashiyama, Shigeaki Fujikawa, Enoch Y. Park, and Sakayu Shimizu. 2015. "Production of Arachidonic Acid by *Mortierella* Fungi." *Biotechnol. Bioprocess Eng* 7(1):252-262.
- Lena Hansson and Milan Dostalek. 1988. "Effect of Culture Conditions on Mycelial Growth and Production of γ -Linolenic Acid by the Fungus *Mortierella Ramanniana*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 28(3): 240–246.
- Ming Hua Liang, and Guo Jiang Jian. 2013. "Advancing Oleaginous Microorganisms to Produce Lipid via Metabolic Engineering Technology." *Progress in Lipid Research* 52(4): 395-408.

- Mozaffarian, Dariush, Eric B Rimm, and David M Herrington. 2004. "Dietary Fats, Carbohydrate, and Progression of Coronary Atherosclerosis in Postmenopausal Women." *Am J Clin Nutr* 80(1): 1175–1184.
- Mo Xian, Yijian Kang, Jicang Yan, Junhong Liu, Yingli Bi, Kaiji Zhen. 2002. "Production of Linolenic Acid by *Mortierella Isabellina* Grown on Octadecanol." *Current Microbiology* 44(2): 141–144.
- Mo. Xian, J. Nie, Q. Meng, J. Liu, C. Zhou, Y. Kang and K. Zhen. 2003. "Production of γ -Linolenic Acid by Disrupted Mycelia of *Mortierella Isabellina*." *Letters in Applied Microbiology* 36(3): 182–185.
- Mo Xian, Yijian Kang, Jicang Yan, Junhong Liu, Yingli Bi, Kaiji Zhen. 2001. "Production of c-linolenic acid by *Mortierella isabellina* grown on hexadecanol" *Letters in Applied Microbiology* 33(1): 367–370.
- Nemailla Bonturi, Leonidas Matsakas, Robert Nilsson, Paul Christakopoulos, Everson Alves Miranda, Kris Arvid Berglund and Ulrika Rova. 2015. "Single Cell Oil Producing Yeasts *Lipomyces Starkeyi* and *Rhodospiridium Toruloides*: Selection of Extraction Strategies and Biodiesel Property Prediction." *Energies* 8(6): 5040–5052.
- PM Kirk, PF Cannon, DW Minter, JA Stalpers. 2008. "*Dictionary of The Fungi.*"
- Seraphim Papanikolaou, Michael Komaitis, and George Aggelis. 2004. "Single Cell Oil (SCO) Production by *Mortierella Isabellina* Grown on High-Sugar Content Media." *Bioresource Technology* 95(1): 287–291.
- Stylianos Fakas, Seraphim Papanikolaou, Athanasios Batsos, Maria

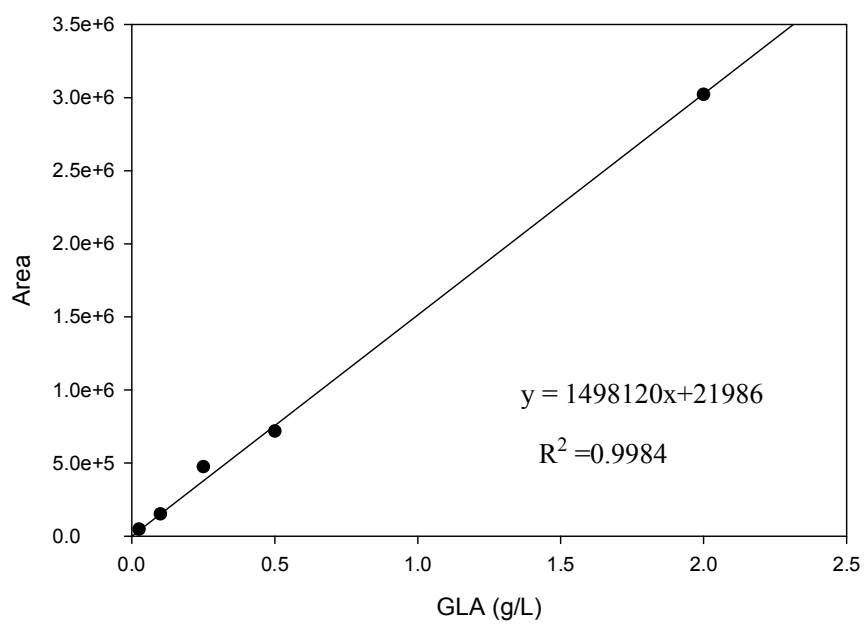
Galiotou-Panayotou, Athanasios Mallouchos, George Aggelis. 2009. "Evaluating Renewable Carbon Sources as Substrates for Single Cell Oil Production by *Cunninghamella Echinulata* and *Mortierella Isabellina*." *Biomass and Bioenergy* 33(4): 573–580.

Xiangyu Li, Ye Lin, Ming Chang, Qingzhe Jin, Xingguo Wang. 2015. "Efficient Production of Arachidonic Acid by *Mortierella Alpina* through Integrating Fed-Batch Culture with a Two-Stage pH Control Strategy." *Bioresource Technology* 181:275-282.

Zhiping Zhang, Xu Zhang, Tianwei Tan. 2014. "Lipid and Carotenoid Production by *Rhodotorula Glutinis* under Irradiation/ high-Temperature and Dark/ low-Temperature Cultivation." *Bioresource Technology* 157:149-153.

附錄

γ -亞麻酸檢量線



GLA 標準檢量線方程式：

$$\text{GLA conc.} = (\text{Peak area} - 21986) / 1498120$$

The enhancement of gamma linolenic acid (GLA) production during the fermentation of *Mortierella isabellina*

研究生：蔡景綸

指導教授：顏宏偉博士 指導教授簽名：_____ 日期：2017/07/29

摘要：

Mortierella isabellina (BCRC31721) 是一株高產油脂之黴菌，生物油脂中含有多種不飽和脂肪酸。且 *M. isabellina* 細胞生長快速、可進行高密度細胞培養，具有相當高的發展潛力。

γ -亞麻酸 (GLA) 是一種人體必需的多元不飽和脂肪酸，在結構上屬於特殊的 Omega-6 系列之必需脂肪酸。為人體不能自行製造、必須從食物中攝取的物質。最初 γ -亞麻酸主要來源於植物種子油，例如月見草、黑醋栗、琉璃苣草等的種子油，而 γ -亞麻酸亦可利用微生物發酵方法大量生產，本實驗研究於 *M. isabellina* 發酵過程中改變發酵策略，使菌體中的 γ -亞麻酸累積量提高。

液態搖瓶發酵實驗中添加界面活性劑 tweem80 後菌體濃度上升， γ -亞麻酸累積量亦會增加，但 γ -亞麻酸之單位菌體產量不會隨 tweem80 添加濃度而改變。液態搖瓶發酵中添加不同濃度之植物油後對菌體濃度提升有顯著效果，但對 γ -亞麻酸累積量無太大影響。在額外添加不同比例之 Hexadecanol 的搖瓶實驗中，當添加濃度為 2 % 時，菌體濃度可達 28.8 g/L， γ -亞麻酸產率為 34.2 mg/L； γ -亞麻酸之單位菌體產量為 1.26 mg/g。以 Hexadecanol 取代葡萄糖作為碳源使用，添加濃度為 2% 時，菌體濃度為 12.5 g/L， γ -亞麻酸產率為 45.2 mg/L； γ -亞麻酸之單位菌體產量為 3.49 mg/g。當放大至 5L 氣舉式發酵槽中進行培養，並額外添加 Hexadecanol 濃度為 2 % 時，菌體濃度為 7.48 g/L， γ -亞麻酸產率為 85.7 mg/L； γ -亞麻酸之單位菌體產量為 4.10 mg/g。若以 Hexadecanol 取代葡萄糖作為碳源使用，添加濃度為 2%，並放大至 5L 氣舉式發酵槽培養，當培養至 72 hr 時 γ -亞麻酸累積量達到最高 195.2 mg/L，為控制組的 3.6 倍；而 GLA/Biomass 亦於 72 hr 時達到最高 21.2 mg/g，為控制組的 2 倍。添加 Hexadecanol 雖無法提高菌體濃度，但菌體可將 Hexadecanol 轉換代謝為脂肪酸，並增加 γ -亞麻酸之累積量。於液態發酵實驗中建立兩階段式變溫策略，培養至 120 hr 時將溫度降為 8°C 進行第二階段培養，得知後期低溫培養有利於 γ -亞麻酸累積，可以有效提升 γ -亞麻酸之單位菌體產量。

關鍵字：M. isabellina、 γ -亞麻酸(GLA)、Hexadecanol、兩階段式變溫

一、前言

近二十年來，由於人們對養生健康和環境污染的日益重視，因此利用生物方法生產 Gamma- Linolenic Acid (GLA)和生質柴油日益受到重視



目前國內外生產的 γ -亞麻酸主要來源於月見草。此植物原產於北美，亦可利用微生物發酵方法大量生產。基於成本、氣候、運輸、量產等因素考量，微生物發酵法具有較大的開發前景。

目前發現能積累 γ -亞麻酸的微生物主要是一些真菌和微藻，其中真菌研究較多的有被孢黴屬 (*Mortierella*)、毛黴屬 (*Mucor*)、枝黴屬 (*Thamnidium*)、小克銀漢黴屬 (*Cunninghamella*)、根黴屬 (*Rhizopus*)、須黴屬 (*Phycomyces*)、接黴屬 (*Zygorhynchus*)和犁頭黴屬 (*Absidia*)等，藻類的研究主要集中在螺旋藻 (*Spirulina*)。但藻類的培養受外界條件的影響較大，用它生產多不飽和脂肪酸有一定難度，真菌在自然界分佈廣且易培養，所以目前利用真菌發酵生產 GLA 已經成為國內外研究熱點。而本實驗是挑選 *Mortierella isabellina* 來進行 GLA 的生產研究。

二、文獻回顧

1. *Mortierella isabellina* 介紹

Mortierella isabellina (深黃被孢黴)屬於真菌，在外觀上，細胞的型態呈長條絲狀，菌落為卵黃色，廣泛的分佈在許多生態中，適合生長 20~28°C，pH5~6 的環境，而 *Mortierella isabellina* 所產的油脂中含有微量 GLA，若將油脂中 GLA 含量提高並有效生產，則微生物發酵產油以提煉 GLA 在未來市場將具有相當大的潛力。

2. *Mortierella isabellina* 的產物介紹

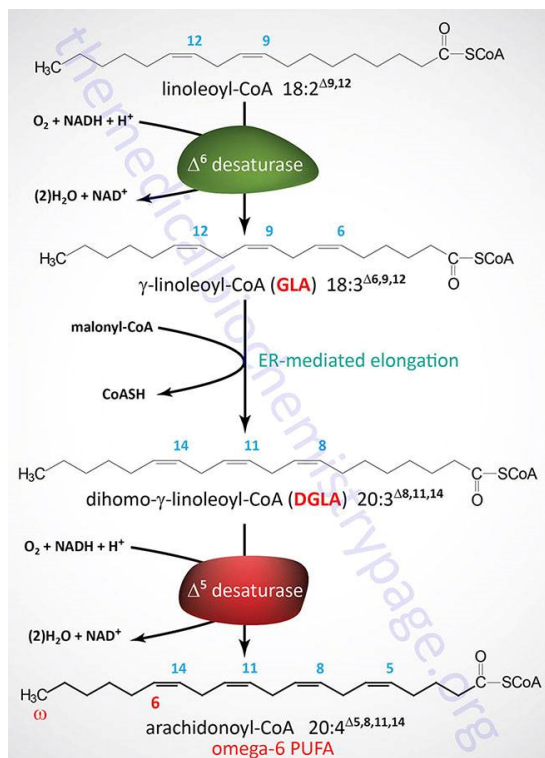
2-1 Gamma- Linolenic Acid (GLA)

GLA 或被稱為 γ 次亞麻油酸，是一種多元不飽和脂肪酸，在結構上屬於特殊的 Omega-6 系列之必需脂肪酸。GLA 是人體不能自行製造的，必須從食物中攝取的物質，除母乳外，只存在於少數植物中，如月見草、黑醋栗、琉璃苣草等。

γ -亞麻酸為全順式 6，9，12 十八碳三烯酸，分子式 $C_{18}H_{30}O_2$ ，是一種 ω -6 系列多不飽和脂肪酸，為無色油狀液體，在空氣中極易被氧化。它是一種人體的必需脂肪酸，在人體內由亞油酸轉化而來，繼而被轉化為雙高亞麻酸

(dihomo- γ -linolenic acid, DGLA) 及花生四烯酸 (arachidonic acid, ARA)，再轉變成前列腺素 E1 (PGE1)、白三烯 (LT) 和前列環素 (PGI2) 等。 γ -亞麻酸具有廣泛的生理活性和明顯的藥理作用，它可以降血脂，抗血栓性心腦血管疾病，預防和治療高血壓、動脈粥樣硬化。同時又能夠抗菌，抗炎，抗腫瘤，抗糖尿病，抗 HIV 感染等，在美容、化妝品行業也有應用，對月經前期綜合症具有一定療效，被高度評

價為“21世紀功能性食品主角”。



3. 三角搖瓶培養

利用三角錐形瓶進行體積 50ml 的菌體培養，操作上較為簡便，可以一次進行多組搖瓶實驗。但氧氣供給速率較差，且除溫度外，難以進行培養環境之調控。常用於種子培養基之培養、菌株篩選、培養基組成探討與最適化。

4. 氣舉式發酵槽

發酵培養上有諸多因素必須考量，如基質內營養條件。再者，環境條件包含了溫度、濕度、含水量以及發酵槽種類等，皆對細胞生長和生產 GLA、油脂的產量有很大的影響。

氣舉式發酵槽的主要特色是以導流檔板分離出流體上升區域與下降區域，氣體由槽體底部進入上升區域並產生氣泡，由於氣體於上升與下降區域中大小分佈不同而產生密度差，使反應槽內形成迴路流動

充分混和發酵液。氣舉式發酵槽具有下列幾項特色：

- (1) 低剪切力傷害：由於沒有機械葉片轉動，因此對於菌體的剪切力傷害可以降到最低，是氣舉式發酵槽適合微生物發酵的主要原因。
- (2) 槽體結構簡單，設備成本低：由於氣舉式發酵槽沒有結構複雜的攪拌系統和機械軸，因此除了減少成本設備外，亦沒有能量消耗的問題。
- (3) 汙染機率降低：由於氣舉式發酵槽沒有結構複雜的攪拌系統，因此不會有軸封滲漏汙染及隱藏雜菌的問題。
- (4) 有較高的能量效率：由於氣舉式發酵槽內導流檔板的導流作用，使得內部的氣體與其帶動之流體在反應槽中能形成穩定之迴路流動不需要外在提供的其他能量。

由上述優點可知，氣舉式發酵槽非常適合用於微生物發酵工業，但若應用於高黏度培養液時，氣體輸送效果會明顯下降，使整循環效果不佳，並容易產生泡沫。

5. 固態發酵

固態發酵包含、液、氣三相的非均相反應，微生物在水分含量較少的固態基質上進行生長，在這種低濕度的環境中，只有少部分微生物可進行發酵，但主要以酵母菌和真菌為主。其原因是因為真菌具有菌絲，可藉由菌絲生長、延伸幫助產生膨脹的壓力，菌絲能穿透進入固態培養基堅硬的表面，形成特殊的生長型態。

固態發酵優點：

- (1) 因為細菌的生長受到低活水性的限制因此固態發酵較不易受到汙染。

- (2) 若產物需要從固態發酵中萃取，只需要較少的溶劑與較低的回收成本。
- (3) 發酵殘餘物的處理非常簡單。
- (4) 微生物利用空氣中之氧氣，降低了通氣的能量成本。

固態發酵缺點:

- (1) 固態基質床的攪拌非常困難，造成基質床的生理、物理、化學環境不均勻，使得固態發酵過程不易控制。
- (2) 微生物呼吸或代謝產生熱使得溫度控制非常困難，因為固態基質床熱傳導系數很低，通常強制進氣式控制培養溫的唯一方法。
- (3) 菌體生長與其他發酵參數的快速測量較為困難實行。
- (4) 缺少有效的方法可用來分析發酵狀況，連續操作與自動化非常困難。

三、實驗目的

本實驗分為四個部分：第一是細胞突變及篩選出 GLA 產量高之菌株；第二是探討固態及液態發酵培養之比較；第三則是於氣舉式發酵槽中添加 Hexadecanol 之發酵培養。

四、實驗材料

本實驗所使用的菌種 *Mortierella isabellina* BCRC31721 (由 BCRC 生物資源保存及研究中心提供)；種子培養基：Yeast extract、PDB (由 ECHO CHEMICAL 提供)；發酵培養基：KH₂PO₄、MgCl₂·6H₂O、ZnSO₄·7H₂O、MnSO₄·H₂O、CaCl₂·6H₂O、FeSO₄·7H₂O、Yeast extract、Glucose (由 ECHO CHEMICAL 提供)



五、實驗步驟

1. *Mortierella isabellina* 培養方法 種子培養基(Seed Medium)

Compounds	Concentration (g/L)
Yeast extract	8.0 g/L
PDB	24.0 g/L

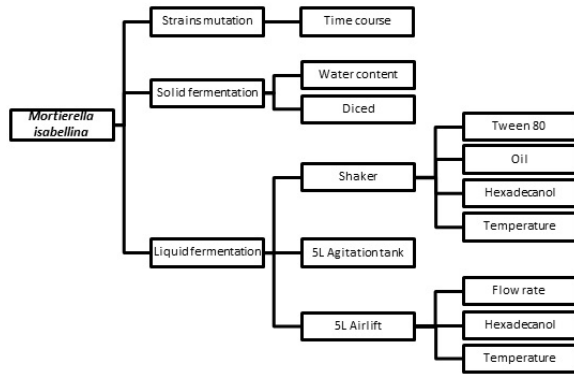
發酵培養基(Fermentation Medium)

Compounds	Concentration (g/L)
KH ₂ PO ₄	1 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.5 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0014 g/L
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0016 g/L
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.0036 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.00275 g/L
Yeast extract	2.74 g/L
Glucose	60 g/L

Step1. 菌種活化：由上表配製種子培養基並且滅菌後接入菌種，放置 24 °C 培養箱 24 hr。

Step.2 接菌：由上表配製發酵培養基並且滅菌後，將培養 24 hr 的種子培養基接入發酵培養基中，接菌量為發酵培養基 10% 的體積。

2. 實驗大綱



3. 分析方法

3-1 菌體濃度分析方法

取出 5 ml 菌液，在轉速 7000 rpm 下離心 10 min，去除上清液取得菌體，再加入 5 ml RO 水，經試管震盪器使菌體與 RO 水充分混合洗去雜質後，再以相同轉速與時間下離心，去除上清液，取出下層菌體並利用紅外線水分蒸發儀，測得菌體乾重 (Dry cell weight, DCW)。

3-2 甘油濃度分析方法

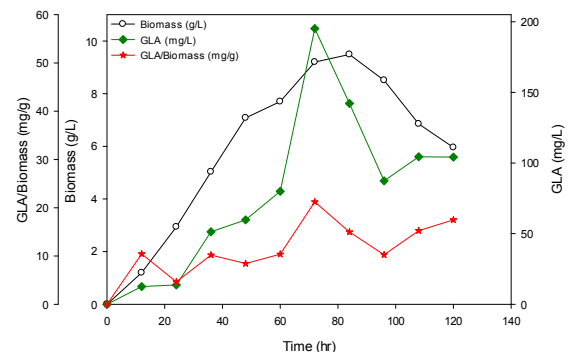
本實驗以 FID-GC (HITACHI) 來進行分析，取出經冷凍乾燥過後的菌體，加入溶劑 (Methnal、Hexane) 使生質油溶於 Hexane 中，進行 GC 分析，使用之管柱為 InertCap FFAP (0.25 mm I.D. x 30 m df= 0.25 μ m)

五、結果討論

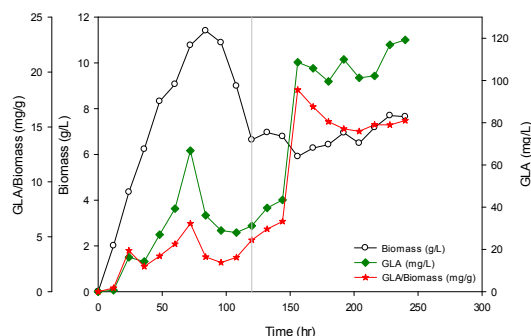
液態搖瓶發酵實驗中添加界面活性劑 tweem80 後菌體濃度上升， γ -亞麻酸累積量亦會增加，但 γ -亞麻酸之單位菌體產量不會隨 tweem80 添加濃度而改變。液態搖瓶發酵中添加不同濃度之植物油後對菌體濃度提升有顯著效果，但對 γ -亞麻酸累積量無太大影響。

在額外添加不同比例之 Hexadecanol 的搖瓶實驗中，當添加濃度為 2% 時，菌體濃度可達 28.8 g/L， γ -亞麻酸產率為 34.2 mg/L； γ -亞麻酸之單位菌體產量為 1.26 mg/g。以 Hexadecanol 取代葡萄糖作為碳源使用，添加濃度為 2% 時，菌體濃度為 12.5 g/L， γ -亞麻酸產率為 45.2 mg/L； γ -亞麻酸之單位菌體產量為 3.49 mg/g。當放大至 5L 氣舉式發酵槽中進行培養，並額外添加 Hexadecanol 濃度為 2% 時，菌體濃度為 7.48 g/L， γ -亞麻酸產率為 85.7 mg/L； γ -亞麻酸之單位菌體產量為 4.10 mg/g。若以 Hexadecanol 取代葡萄糖作為碳源使用，添加濃度為 2%，並放大至 5L 氣舉式發酵槽培養，當培養至 72 hr 時 γ -亞麻酸累積量達到最高 195.2 mg/L，為控制組的 3.6 倍；而 GLA/Biomass 亦於 72 hr 時達到最高 21.2 mg/g，為控制組的 2 倍。添加 Hexadecanol 雖無法提高菌體濃度，但菌體可將 Hexadecanol 轉換代謝為脂肪酸，並增加 γ -亞麻酸之累積量。

於液態發酵實驗中建立兩階段式變溫策略，培養至 120 hr 時將溫度降為 8°C 進行第二階段培養，得知後期低溫培養有利於 γ -亞麻酸累積，可以有效提升 γ -亞麻酸之單位菌體產量。



以 Hexadecanol 取代 Glucose 對 γ -亞麻酸累積之影響



兩階段溫度變化對 γ -亞麻酸累積之影響

六、參考文獻

1. Carvalho, Patrícia De Oliveira, Joaquim GilbertoDeOliveira, andGláucia MariaPastore. 1999. "Enhancement of Gamma-Linolenic Acid Production by the Fungus *Mucor* Sp LB-54 by Growth Temperature." *Revista de Microbiologia* 30(2): 170–75.
2. Chen, H.-C., andC.-C.Chang. 1996. "Production of γ -Linolenic Acid by the Fungus *Cunninghamella Echinulata* CCRC 31840." *Biotechnology Progress*.
3. Fakas, Stylianos et al. 2009. "Evaluating Renewable Carbon Sources as Substrates for Single Cell Oil Production by *Cunninghamella Echinulata* and *Mortierella Isabellina*." *Biomass and Bioenergy* 33(4): 573–80.
4. Hansson, Lena, andMilanDostalek. 1988. "Effect of Culture Conditions on Mycelial Growth and Production of γ -Linolenic Acid by the Fungus *Mortierella Ramanniana*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 28(3): 240–46.
5. Hibbett, David S. et al. 2007. "A Higher-Level Phylogenetic Classification of the Fungi." *Mycological Research* 111(5): 509–47.
6. Kirk, P.M., P.F.Cannon, D.W.Minter, andJ.A.Stalpers. 2008. *Mycological Research Dictionary of The Fungi*.
7. Li, Xiangyu et al. 2015. "Efficient Production of Arachidonic Acid by *Mortierella Alpina* through Integrating Fed-Batch Culture with a Two-Stage pH Control Strategy." *Bioresource Technology*.
8. Xian, Mo et al. 2002. "Production of Linolenic Acid by *Mortierella Isabellina* Grown on Octadecanol." *Current Microbiology* 44(2): 141–44.
9. Zhang, Zhiping, XuZhang, andTianweiTan. 2014. "Lipid and Carotenoid Production by *Rhodotorula Glutinis* under Irradiation/ high-Temperature and Dark/ low-Temperature Cultivation." *Bioresource Technology*.