

國立成功大學補助專題研究計畫成果報告

以台灣本土之海洋異營性微細藻類生產 n-3 多元不飽和脂肪酸 (II)

Production of n-3 polyunsaturated fatty acids using Taiwan indigenous marine heterotrophic microalgae (II)

計畫主持人：陳逸民

執行單位：海洋中心，生物科技研究所

中 華 民 國 98 年 7 月 30 日

(一) 計畫中文摘要。(五百字以內)

台灣海洋中存在許多富含二十碳五烯酸 (EPA) 以及二十二碳六烯酸 (DHA) 之異營性微細藻類，過去未能評估其是否具有商業價值。因此本研究的目的即在開發台灣富含 n-3 多元不飽和脂肪酸的優質異營性微細藻類品系。

研究期間我們共獲得 25 個異營性藻株品系。利用 18SrDNA 的分析以及脂肪酸組成的比對，可將這些藻株分成 8 群，其中 *Aurantiochytrium* 是最具量產 DHA 潛力的分群。我們將其中最具潛力的藻株 BL10 進行培養條件的最適化。在以 10L 發酵槽進行培養，可在 4.5 天內由 2gL^{-1} 的初始培養密度長到 57gL^{-1} ，細胞內含 17.4% 的 DHA，顯示 BL10 是一個良好量產 DHA 的藻株。

關鍵字：異營性微藻、二十二碳六烯酸

(二) 計畫英文摘要。(五百字以內)

Some of the EPA or DHA-rich marine heterotrophic algae have been found in Taiwan; however, there are still lacking detail analysis, characterization of these indigenous algae and developed for commercial application. Hence, the purpose of this study is to screen for Taiwan indigenous EPA or DHA-rich heterotrophic microalgae.

25 heterotrophic algal strains have been isolated from various marine habitats of Taiwan. They can be separated into 8 monophylogenetic groups according to their 18SrDNA sequences and fatty acid profiles.

An *Aurantiochytrium* strain BL10 with high DHA production was subsequently chosen for further manipulation. Under optimal conditions using 10 L fermenter, it could grow from 2 g to 57gL^{-1} in 4.5 day, with dry biomass containing 17.4% DHA, demonstrating BL10 as an excellent source of microbial DHA.

Keywords: heterotrophic microalgae, DHA

一、工作項目

- (1) 本土異營性微藻品系的純化、保存與鑑定與脂肪酸組成分析
- (2) BL10 的量產條件分析

二、結果

- (1) 本土異營性微藻品系的純化、保存與鑑定與脂肪酸組成分析

我們一共由台灣各地取得 25 株的異營藻。採樣的地點及棲地如表一所示。

後續進行藻株 18SrDNA 的分析，在獲得其 18SrDNA 序列後，將所有藻株的資料，連同一些 NCBI genebank 內近似藻種的資料，一同進行親緣關係分析的結果如圖一所示。由此可將這些藻株分成八群，其中有五群為 *Thraustochytrium* spp.，另三群分別屬於 *Aurantiochytrium*、*Aplanochytrium*、以及 *Oblongichytrium*。

將各個分群中任取一個藻株，放在 H medium (yeast extract/monosodium glutamate/glucose = 0.2/0.5/2 gL⁻¹ in seawater) 內培養後，所得到的型態特徵如表二所示。這些型態特徵可進一步的驗證 18SrDNA 的鑑定結果。

藻株脂肪酸的形式如圖二所示。由高度多元不飽和脂肪酸在總脂肪酸中的的比例、n-3/n-6 C22:5 (DPA) 的相對量、以及 C20:3n-6 或 C20:4n-6 的有無，可將這些藻株的脂肪酸組成分成七群。藻株的脂肪酸組成和其分類地位有關。親緣關係越近的種類，脂肪酸的組成會越接近，因此可以利用脂肪酸組成作為藻種鑑定的依據。按脂肪酸組成所做的分類檢索表如表三所示。

各藻株的可培養密度、總脂量、EPA 和 DHA 兩種長鏈不飽和脂肪酸的量的比較如圖三所示。BL10 有最高的 DHA 含量，可培養密度也最高，因此是所有現有藻株中，可用以量產 DHA 的最佳藻種。因此後續便針對本藻株進行量產條件的分析。

- (2) BL10 的量產條件分析

BL10 的發酵槽條件如下所示：

初始培養基組成* (gL ⁻¹)	初始 體積 (L)	葡萄糖匱料 濃度、體積	溫度 (°C)	打氣量 (Lmin ⁻¹)	搖晃或攪拌速率 (rpm)
P/Y/AS= 5.3/10.7/1.3 SO=0.3 Adjust to pH 7.1 by NH ₄ OH	4.50	0.6g/mL, 共 1.5 L 200mL at 0, 0.5, 1, 1.5d 100mL at	27°C (氣溫)	5.0(0-5d) 1.0(5-6.5d)	Blending, 300 (0-5d) 150 (5-6.5d)

Salinity 10 ppt	2d
	150mL at
	2.5, 3, 3.5, 4d

* **P**: peptone; **Y**: yeast extract; **G**: glucose; **AS**: ammonium sulfate; **AA**: ammonium acetate

SO: soybean oil, as antifoam

以 300 mL、密度 34.2 gL^{-1} 的 BL10 藻液進行接種。接種後每隔 12 小時取樣一次，分析細胞密度及 packed cell volume (PCV) 取樣後立即進行匱料。進行最後 4 個採樣點的 DHA 含量以及殘糖量分析。在培養 5 天時將打氣量減小至 1.0 L，同時將攪拌轉速由 300 rpm 調降為 150 rpm，觀察其對於 DHA 含量的影響。

由此所得的生長曲線及 pH 值的變化如圖四所示，在接種 2.5-3 天後可以達到原接種液的濃度，而在 4.5-5 天後即可以達到最高密度，然而要到第 6.5 天才有較高的 DHA 含量。第 4.0、4.5、5.0 細胞內的 DHA 含量僅有 10.7%-11.4%。由層析圖譜得知，此 3 個點的 DHA 比例偏低，僅佔總脂肪酸的 33.6-38.3%，同時 DPA 的比例偏高，佔總脂肪酸含量的 9.4%-10.2% (圖五)。

在第 5 天將打氣量及攪拌速率調低的作法，顯然有助於提高 DHA 的比例及含量。由殘糖的分析，以知在培養 5 天後已經沒有任何的耗糖現象 (第 5 及 6.5 天的殘糖量分別為 5.8 及 6.2 gL^{-1})，顯然此 DHA 含量的提升和耗糖沒有關係，由過去實驗的經驗，以知在相同的培養條件下，脂肪酸組成的變化不太會隨培養時間而有差異；培養到末期所觀察到 DHA 含量的明顯提升，通常和細胞大量累積脂肪酸，而非 DHA 的比例提高有關。在本實驗中卻觀察到第 6.5 天和第 5 天的脂肪酸組成間有的明顯差異，其中 DHA 的比例由原本的 35.9% 提高到 47.9%，細胞內含量也由 10.7% 快速提高到 17.4%，其他脂肪酸的組成也變得較為單純。由此推測將打氣量及攪拌量調低的作法，確實有助於細胞內 DHA 的合成。此種低溶氧促進 DHA 合成的情形，同樣可在完全不打氣的 No 1 組別中發現，獲得印證。

pH 值的變化情形和 No 2 組十分近似，在急遽的掉到 3.0 後開始緩慢提升。

PCV 和單位體積乾藻重的關係如圖六所示。利用非線性迴歸所得到的相關係數值較線性迴歸來的理想，因此後續將以此作為由 PCV 推測細胞密度的依據。

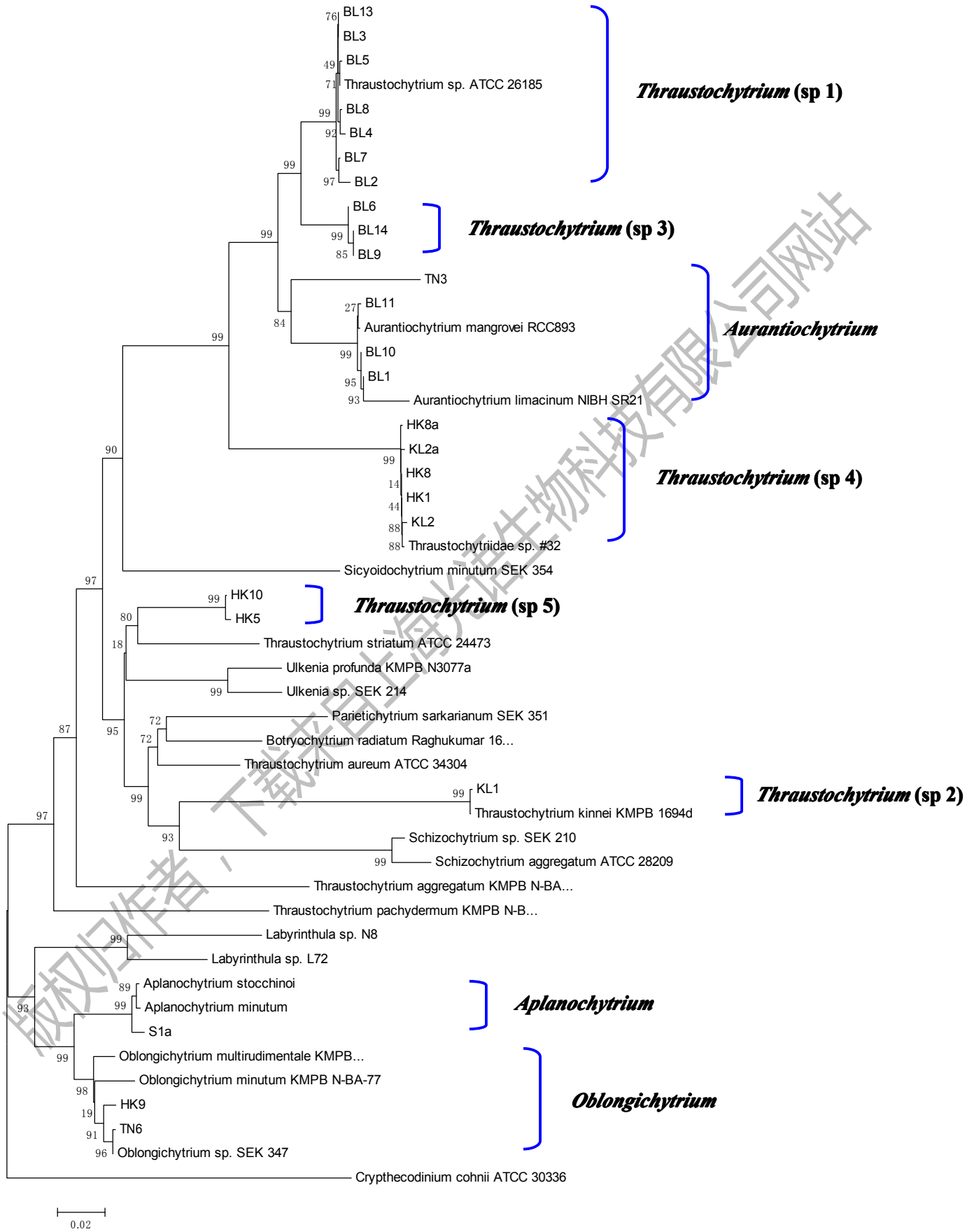
在轉換率方面，本組培養到第 6.5 天時每升共消耗約 156.8g 培養基，獲得的藻密度為每升 57.7g，由此所得的轉換率達 36.7%。

表一、

Algal strain	Collection date	Collection site	Habitat
KL-series	Feb, 2007	Keelung (1)	Rocky shore
BL-series	Jan, 2007	Bali (2)	Mangrove
TN-series	Feb, 2007	Tainan (3)	Mangrove
S1a	Jul, 2007	Tainan (3)	Salt marsh
HK-series	Nov, 2006	Haikou (4)	Coral reef



版权归作者所有，下载来自上海光语生物科技有限公司网站

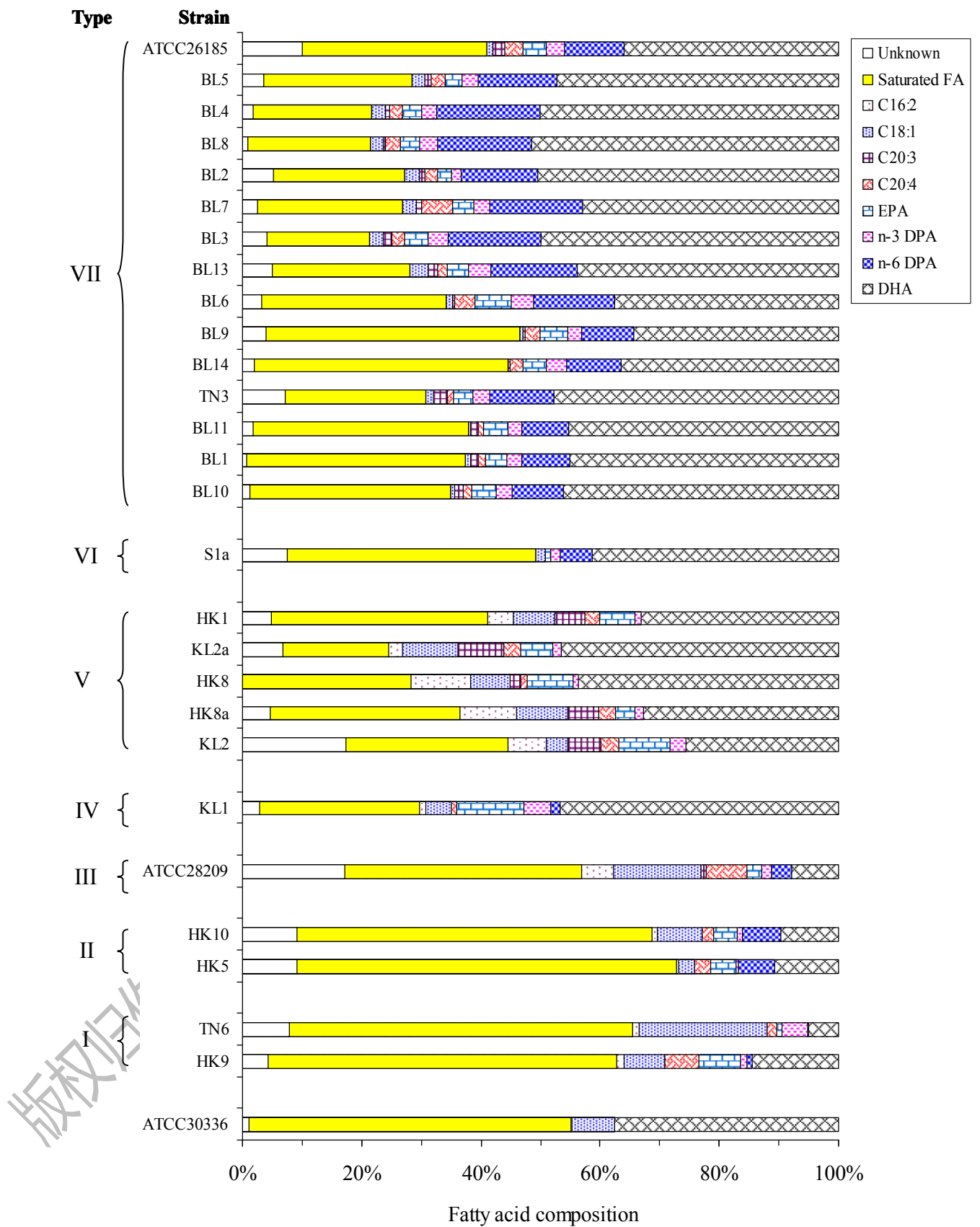


圖一、

表二、

Strain	Formation of zoospores	Gliding of vegetative cells in an extended period	Thallus occurring successive binary division	Formation of ectoplasmic net	Formation of amoeboid cells
BL2	Yes	No	No	No well-developed	No
BL9	Yes	No	No	No well-developed	No
TN3	Yes	No	Yes	No well-developed	No
BL10	Yes	No	Yes	No well-developed	Yes
HK1	Yes	No	No	No well-developed	No
HK10	Yes	No	No	No well-developed	No
KL1	Yes	No	No	No well-developed	No
S1a	No	Yes	Yes	No well-developed	No
TN6	Yes	No	Yes	Well-developed	No

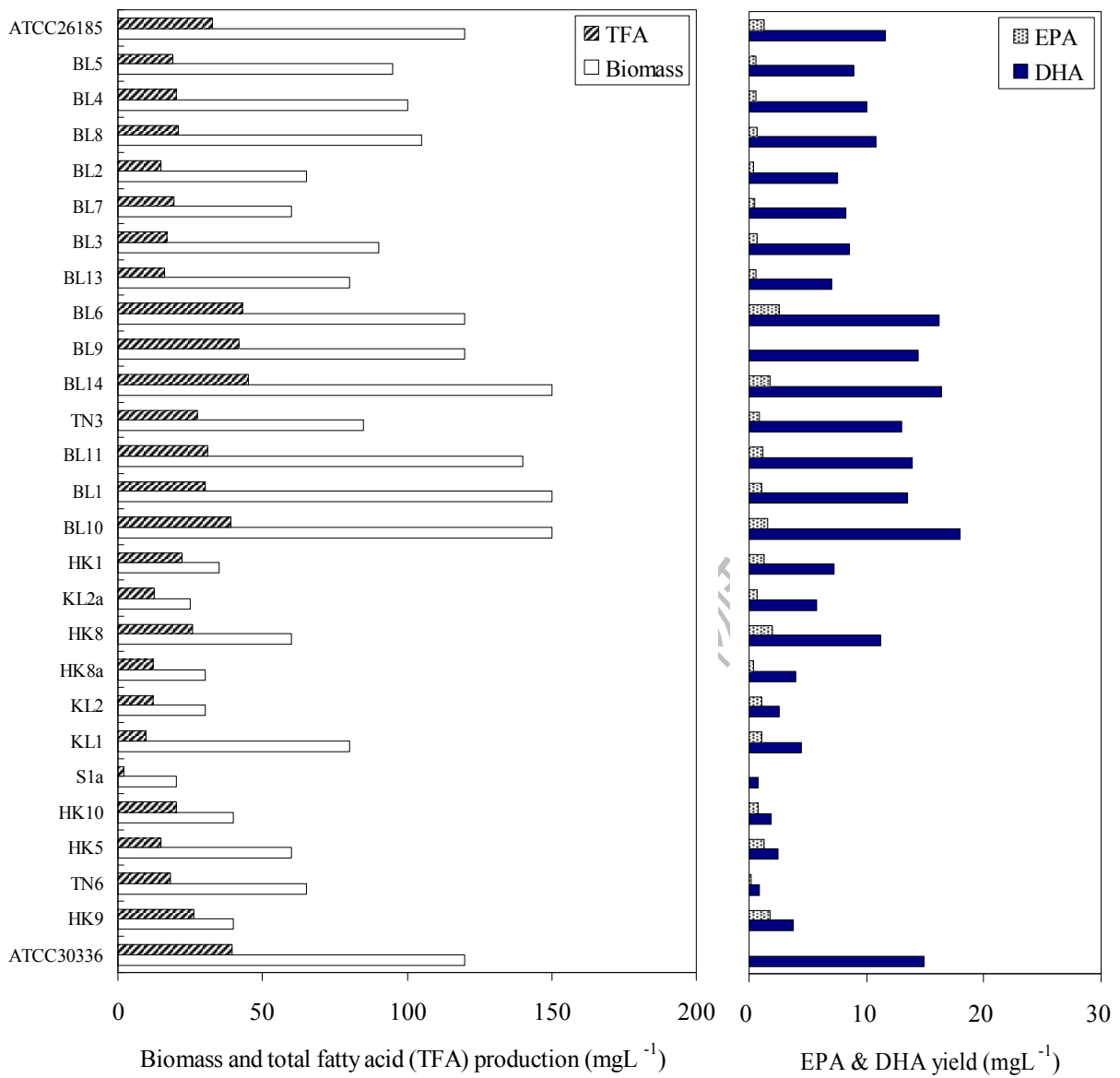
版权归作者，下载来自上海光语生物科技有限公司网站



圖二、

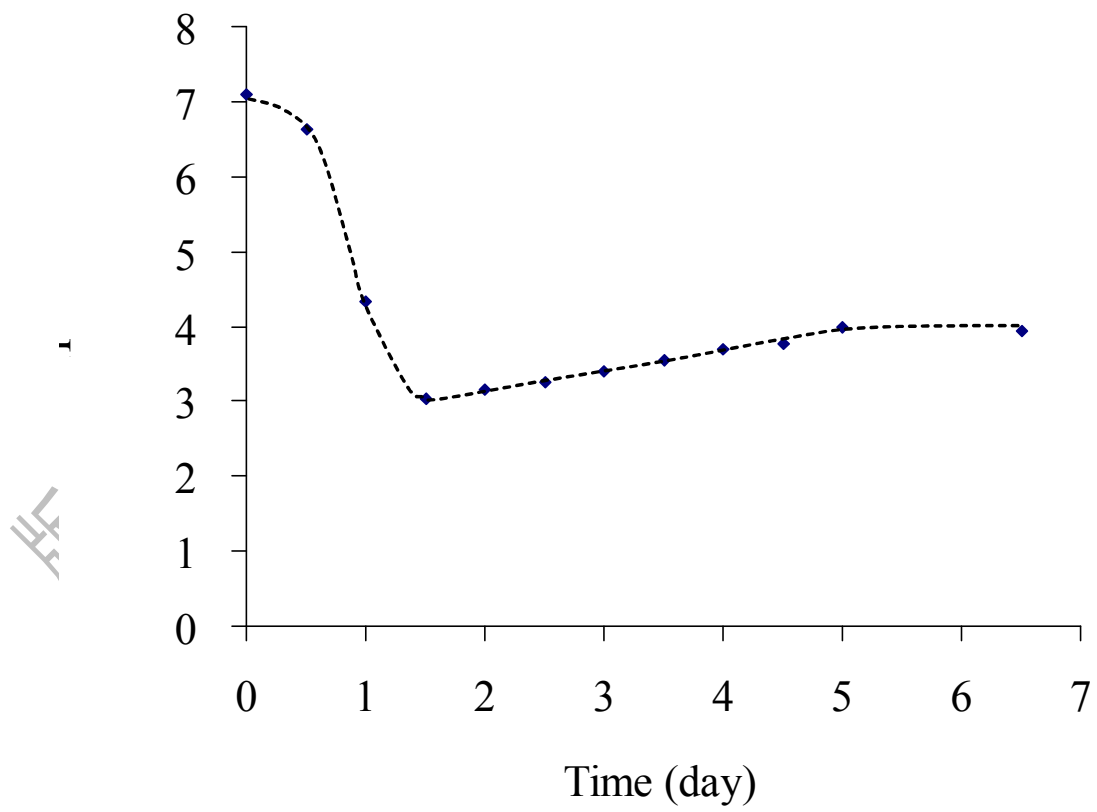
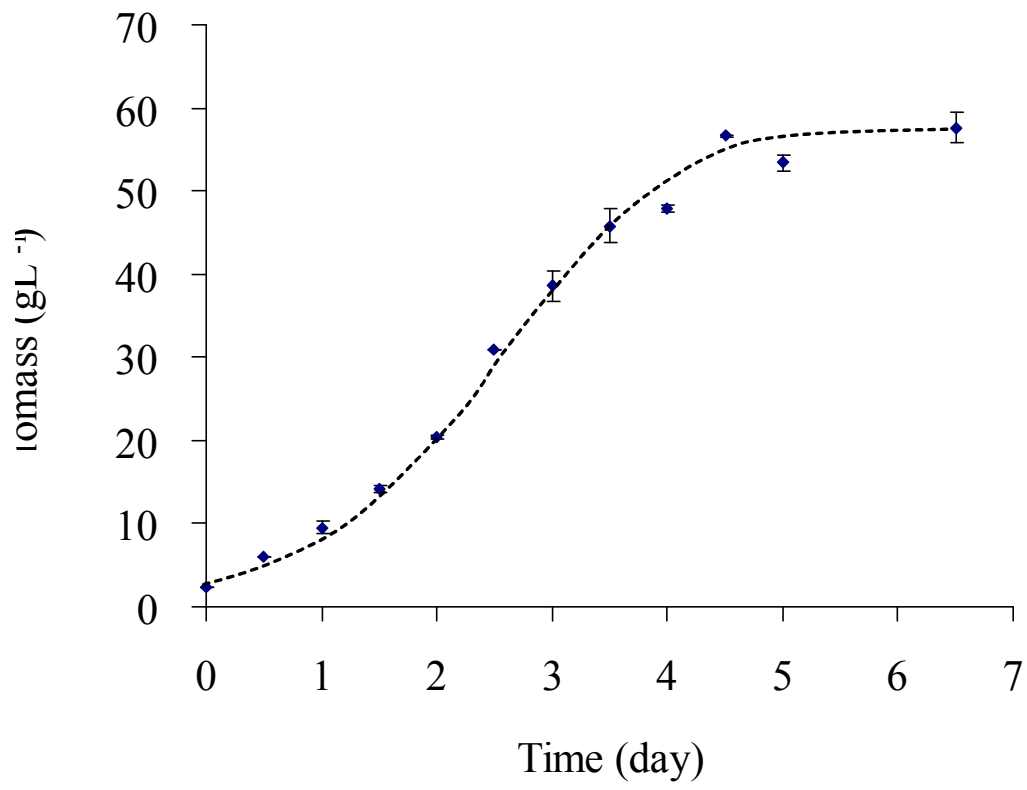
表三、

1. Total HUFAs content lower than 30% of total fatty acids... 2
1. Total HUFAs content higher than 40% of total fatty acids... 4
2. (n-3 DPA content) > (n-6 DPA content)..... *Oblongichytrium* sp. **(Type I)**
2. (n-3 DPA content) < (n-6 DPA content)..... 3
3. C20:3n-6 is not present..... *Thraustochytrium* sp. 5 **(Type II)**
3. C20:3n-6 is present..... *Schizochytrium aggregatum* **(Type III)**
4. (n-3 DPA content) > (n-6 DPA content)..... 5
4. (n-3 DPA content) < (n-6 DPA content) 6
5. C20:3n-6 is not present..... *Thraustochytrium* sp. 2 **(Type IV)**
5. C20:3n-6 is present..... *Thraustochytrium* sp. 4 **(Type V)**
6. C20:3n-6 and C20:4n-6 are not present..... *Aplanochytrium* sp. **(Type VI)**
6. C20:3n-6 and C20:4n-6 are present..... *Thraustochytrium* sp. 1 **(Type VII)**
Thraustochytrium sp. 3 **(Type VII)**
Aurantiochytrium sp. 1 **(Type VII)**
Aurantiochytrium sp. 2 **(Type VII)**



版权归作者所有

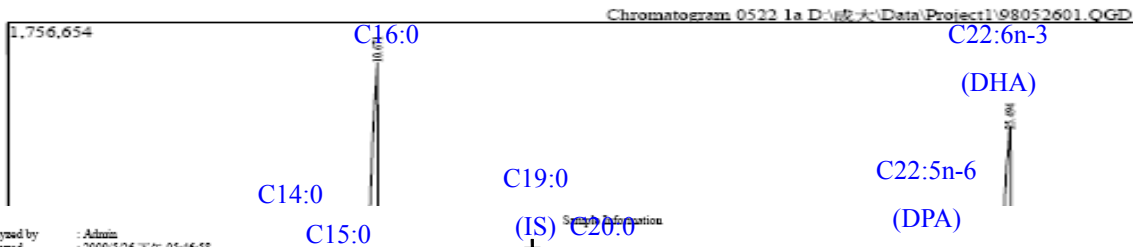
圖三、



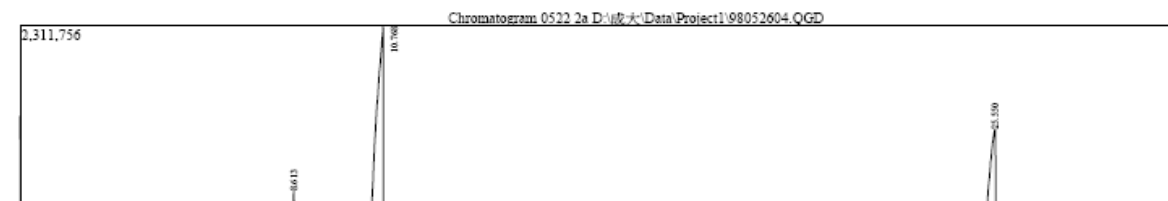
圖四

版权归作者，下载来自上海光语生物科技有限公司网站

Data File : D:\成大\Data\Project1\98052601.QGD
 Org Data File : D:\成大\Data\Project1\98052601.QGD
 Method File : D:\成大\Data\Project1\SP2380BL10.qgm
 Org Method File : D:\成大\Data\Project1\SP2380BL10.qgm
 Report File :
 Tuning File : D:\成大\Data\Project1\20080509.egt
 Modified by : Admin
 Modified : 2009/3/26 下午 04:27:19



Analyzed by : Admin
 Analyzed : 2009/3/26 下午 05:46:58
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : 0522 2a
 Sample ID : 0522 2a
 IS Amount : (1)=1.000
 Sample Amount : 1.000
 Dilution Factor :
 Vial # :
 Injection Volume : 1.000
 Data File : D:\成大\Data\Project1\98052604.QGD
 Org Data File : D:\成大\Data\Project1\98052604.QGD
 Method File : D:\成大\Data\Project1\SP2380BL10.qgm
 Org Method File : D:\成大\Data\Project1\SP2380BL10.qgm
 Report File :
 Tuning File : D:\成大\Data\Project1\20080509.egt
 Modified by : Admin
 Modified : 2009/3/26 下午 06:16:58



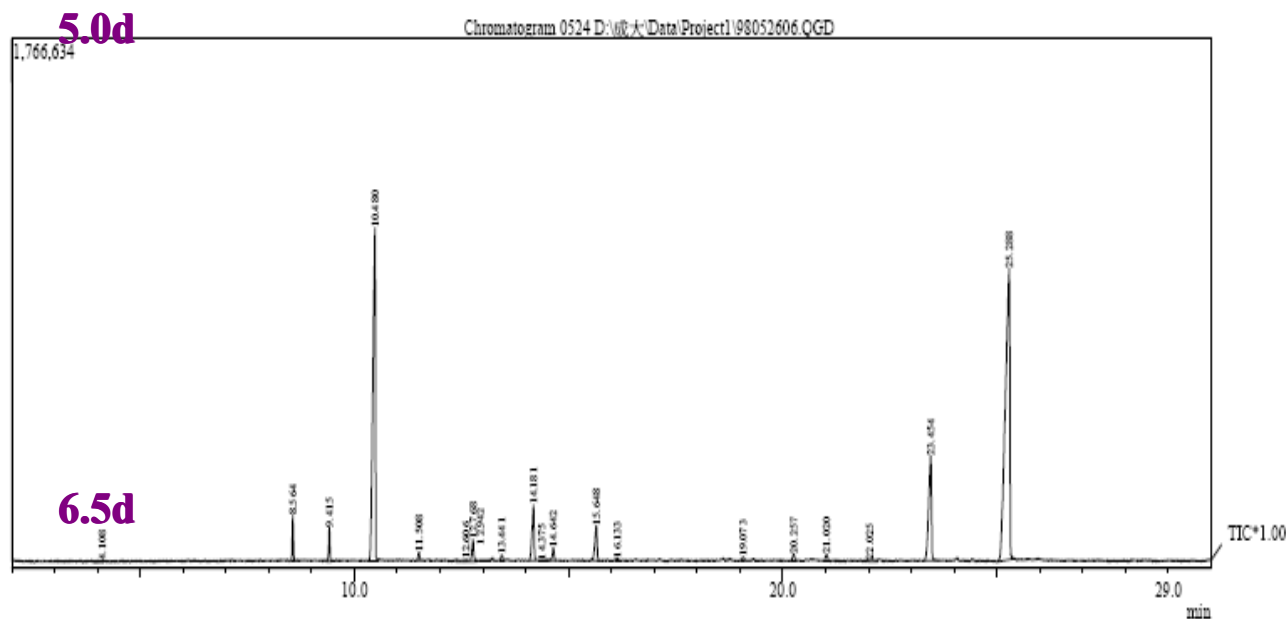
Analyzed by : Admin
 Analyzed : 2009/3/26 下午 06:24:33
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : 0523 1A
 Sample ID : 0523 1A
 IS Amount : (1)=1.000
 Sample Amount : 1.000
 Dilution Factor :
 Vial # :
 Injection Volume : 1.000

4.5d

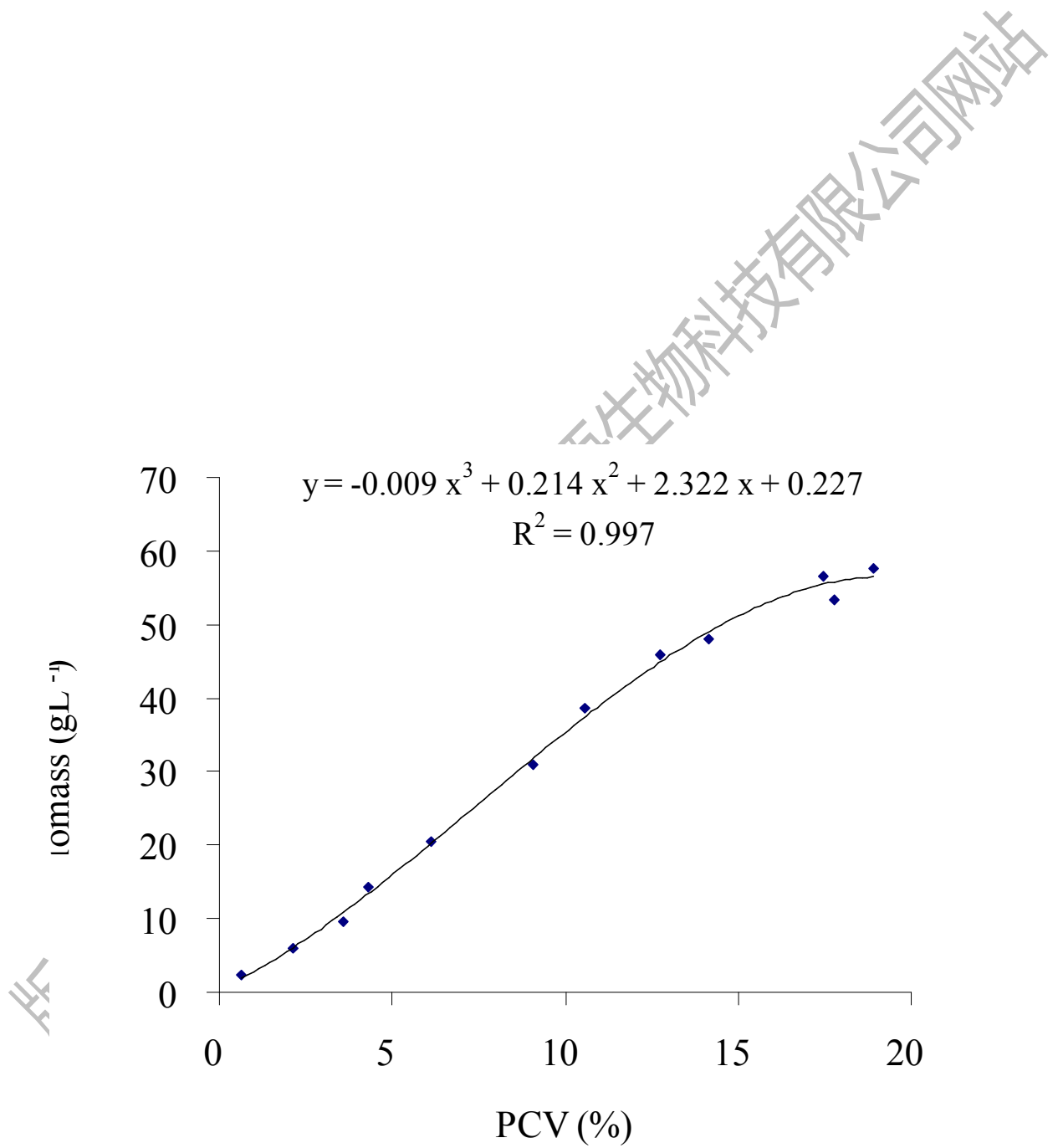
TIC*1.00

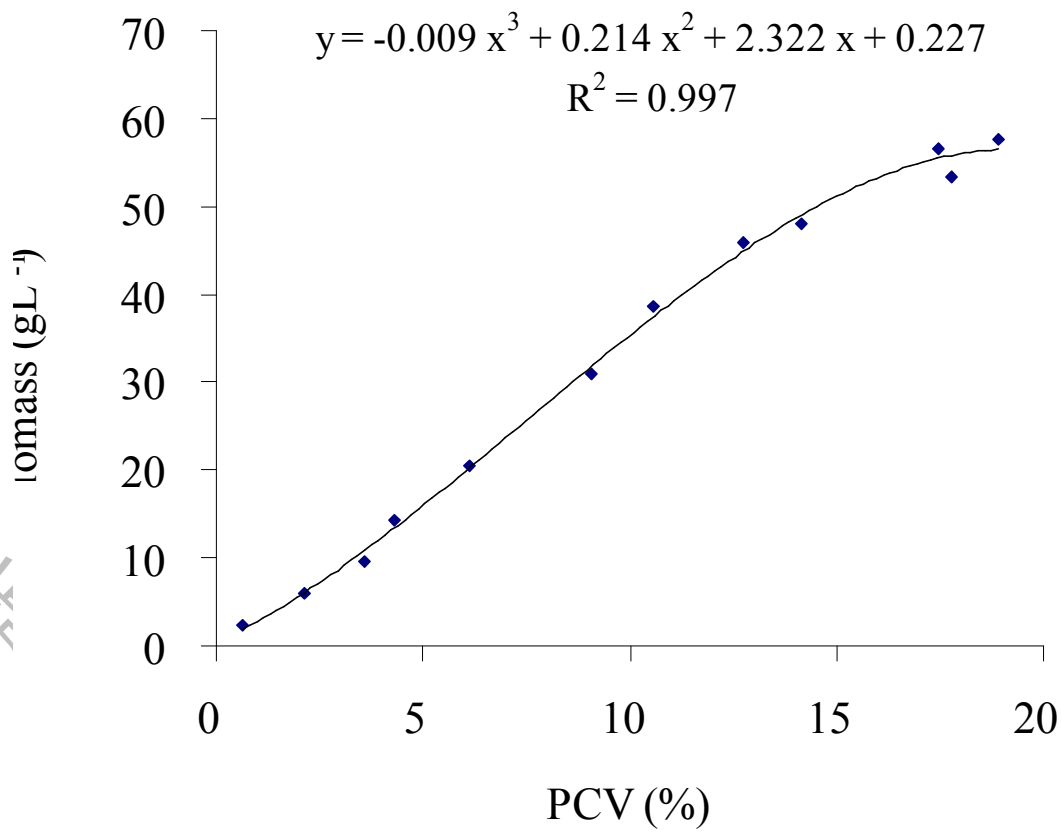
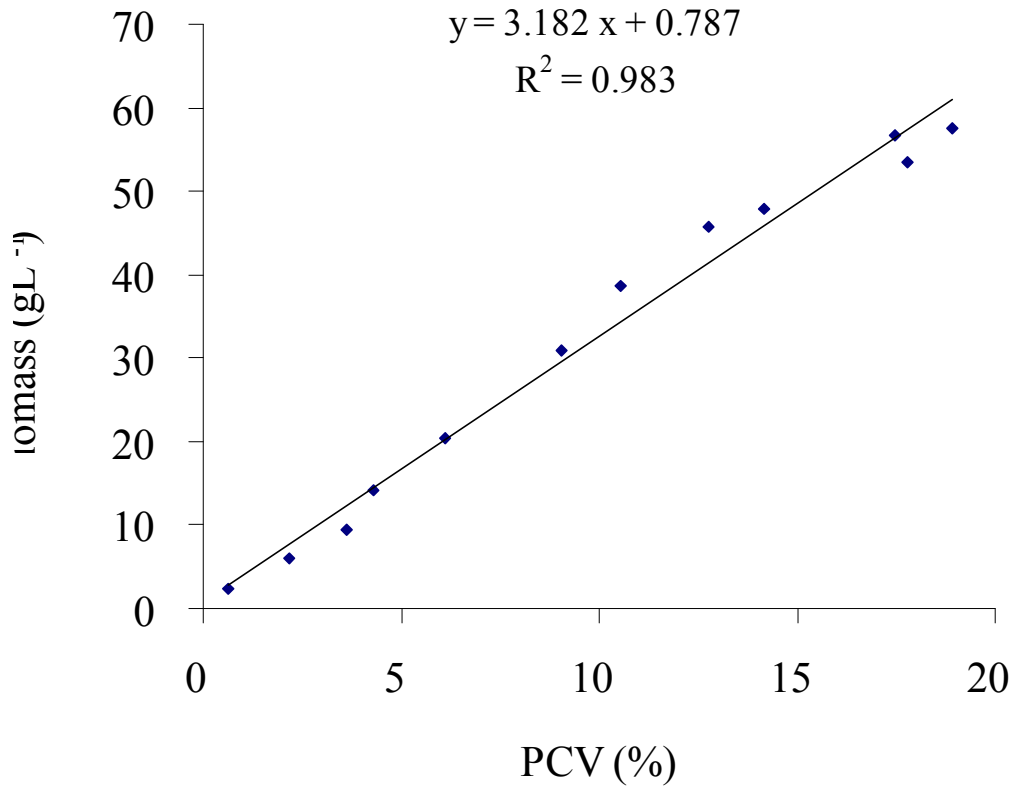
Sample Information

Analyzed by : Admin
 Analyzed : 2009/3/26 下午 06:57:49
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : 0524
 Sample ID : 0524
 IS Amount : (1)=1.000
 Sample Amount : 1.000
 Dilution Factor : 1.000
 Vial # : 1
 Injection Volume : 1.000
 Data File : D:\成大\Data\Project1\98052606.QGD
 Org Data File : D:\成大\Data\Project1\98052606.QGD
 Method File : D:\成大\Data\Project1\SP2380BL10.qgm
 Org Method File : D:\成大\Data\Project1\SP2380BL10.qgm
 Report File :
 Tuning File : D:\成大\Data\Project1\20080509.egt
 Modified by : Admin
 Modified : 2009/3/26 下午 07:27:49



圖五、





圖六

五、總結

1. 在目前最佳的培養條件下，BL10 可在 4.5 天由 2gL^{-1} 長到 56gL^{-1} 。由於此為 10 升發酵槽的數據，可依此作為擴充培養條件的依據。
2. 欲進一步提高 DHA，可由在生長末期添加足量的糖，搭配降低打氣量及攪拌速率來達成。
3. Peptone 及 yeast extract 的成本太高。將在後續提出替代方案。

六、具體成果

1. Paper

Yang H.-L., Lu C.-K., Chen S.-F., Chen Y.-M. and **Chen Y.-M.***, 2009. Isolation and characterization of Taiwanese heterotrophic microalgae: screening of strains for docosahexaenoic acid (DHA) production. *Marine Biotechnology*, in press. (SCI)

2. 專利

「富含 DHA 之藻株及其應用」。台灣專利，申請中，申請案號 98107877。

3. 技轉

「BL10 藻株生產技術」。成功大學與味丹生物科技公司技轉方案，金額 **2,510 萬**。

4. 國際會議

Chen Y.-M., Chen S.-F., Lu C.-K., Lin. H.-Y., Chen T.-Y., and Yang H.-L., 2008 Isolation and characterization of Taiwanese thraustochytrid species: screening of strains for docosahexaenoic acid (DHA) production. Aquaculture Europe 2008, Krakow, Poland.

榮獲最佳海報獎 (Best Poster Award)。

七、成果自評

本年度原本預計完成計畫為：

1. 完成項目：建立國內第一個異營藻類種源庫；BL-10 的培養條件的最適化。
2. 成果：國內學術會議、國際學術期刊、專利及技轉各一。

符合進度。