

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用尼羅紅篩選高油脂含量酵母菌 (*Rhodotorula glutinis*) 並進行高密度培養以作為生質柴油之油脂來源
研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 100-2221-E-029-012-
執行期間：100年08月01日至101年07月31日
執行單位：東海大學化學工程與材料工程學系

計畫主持人：顏宏偉

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：江偉誠
碩士班研究生-兼任助理人員：蕭新培

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中華民國 101 年 10 月 15 日

中文摘要： 利用 NTG 進行紅酵母菌種突變與高油脂菌種篩選，得到油脂含量高達 60-70% 數株菌種，且探討不同碳源選項以及饋料批次對於紅酵母油脂累積之影響性。

中文關鍵詞： 紅酵母，生質柴油

英文摘要：

英文關鍵詞：

利用尼羅紅篩選高油脂含量酵母菌 (*Rhodotorula glutinis*)並進行高密度培養以作
為生質柴油之油脂來源
100-2221-E-029-012-

顏宏偉

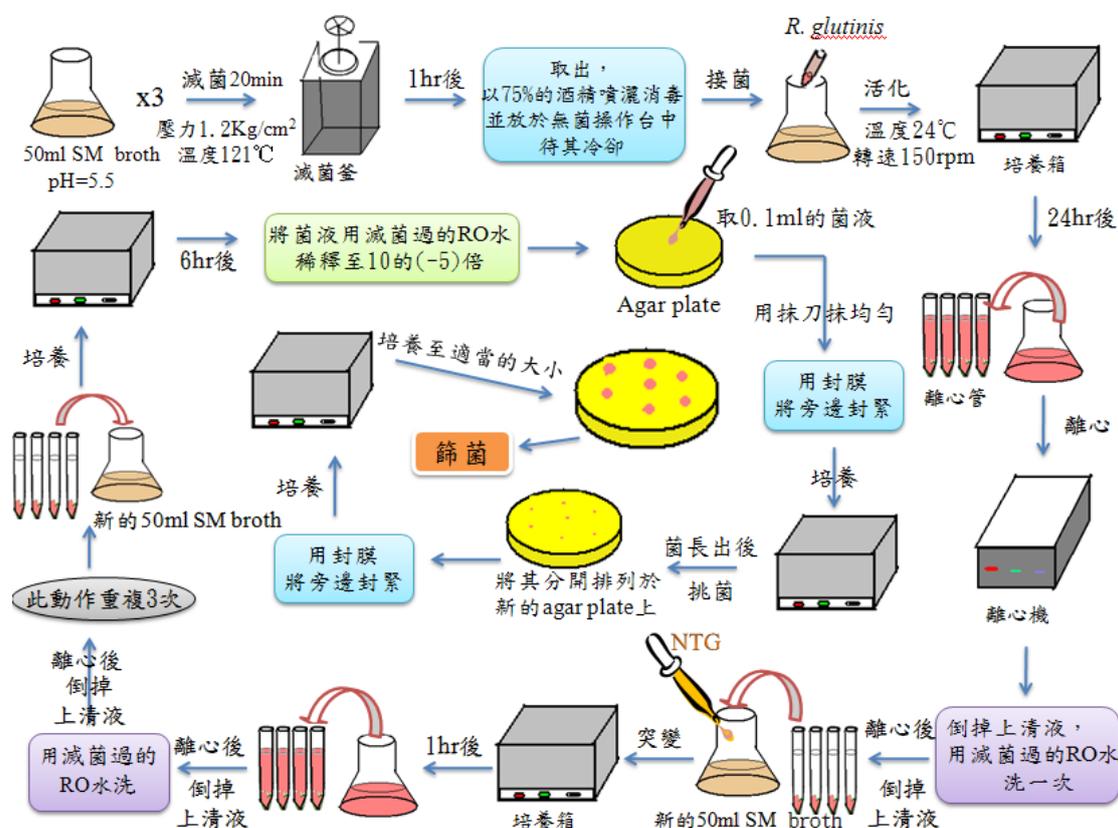
結果與討論

一. 利用尼羅紅進行高油脂紅酵母菌篩選結果

實驗基本架構圖



R. glutinis 突變 篩選流程

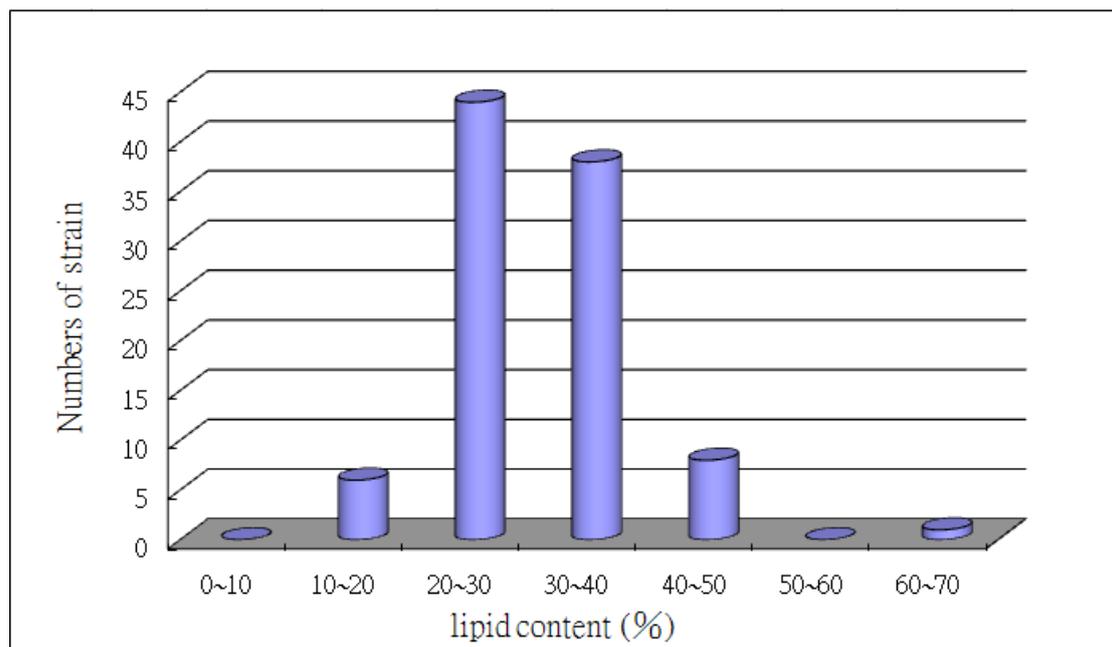


NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 突變劑

本研究利用突變劑NTG誘導*R. glutinis*，突變篩選出高油脂菌株。

NTG 為化學誘變劑，已被廣泛用於誘導突變的細菌和酵母，其可導致生物

體發生基因的突變，NTG 誘發的突變主要是 GC—AT 轉換，另外還有小範圍切除、移碼突變及 GC 對的缺失，在自然條件下 NTG 容易分解，而在酸性 (PH=5.5) 條件下會產生 HNO_2 ，雖然 HNO_2 本身就是誘變劑，但在 NTG 有活性時 (PH=6~9)，它卻無誘變效果。在鹼性條件下，NTG 會形成重氮甲烷 (CH_2N_2)，它是引起致死和突變的主要原因，它的效應很可能是 CH_2N_2 對 DNA 的烷化作用引起的。



NTG 突變後，篩菌之結果

實驗結果顯示 NTG 突變後篩菌，可得油脂含量最高達 60-70%，而平均油脂含量可約為 30-40% (g/g)。此結果說明 NTG 突變是一個不錯的方法，頗適合做為未來進行高油脂菌種篩選之標準方法。

二. 高油脂紅酵母培養製程最適化

(a) 250 ml 搖瓶；(b) 批次發酵裝置圖；(c) 三盞 LED 燈批次發酵程序裝置圖



Rhodotorula glutinis 之脂肪酸分析結果

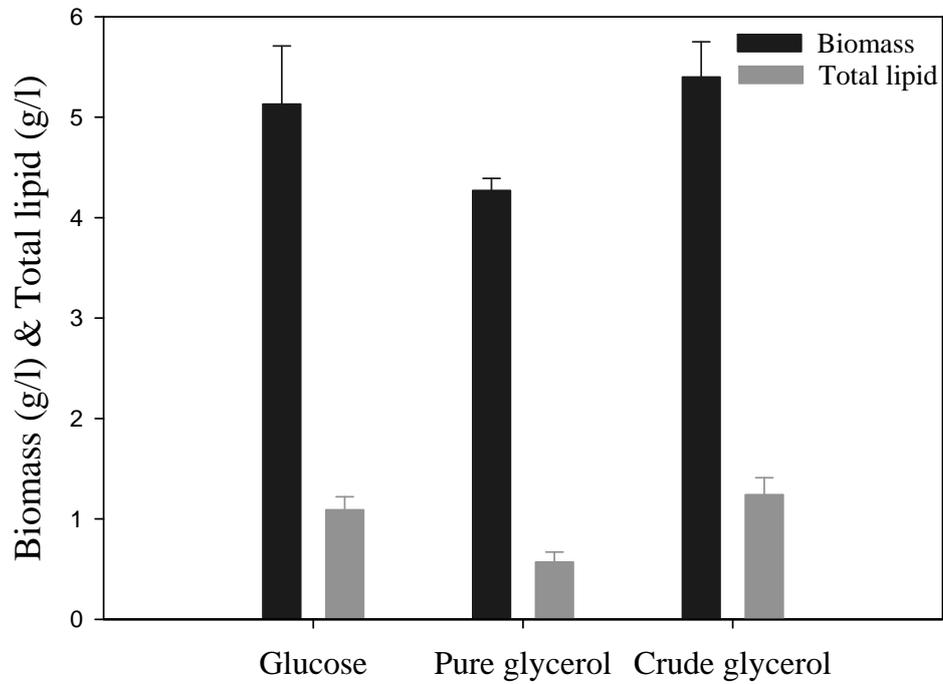
首先對於菌種中心所取得之 *R. glutinis* BCRC22360 進行初步之脂肪酸組成分析。利用 Bong Kyun Kim 等 (2004) 所最適化出來的培養基培養，從已轉酯化處理後的樣品中萃取出脂肪酸甲酯，利用氣相層析分析組成。在定性方面，與脂肪酸標準品對照得知 (附錄 B)，*R. glutinis* 中的脂肪酸組成包含 C14:0 (滯留時間為



11.47 分鐘)、C16:0 (滯留時間為 15.66 分鐘)、C16:1 (滯留時間為 16.56 分鐘)、C18:0 (滯留時間為 22.59 分鐘)、C18:1 (滯留時間為 23.73 分鐘)、C18:2 (滯留時間為 26.19 分鐘)、C18:3 (滯留時間為 30.11 分鐘)。由氣相層析儀分析顯示，油脂酵母菌 *Rhodotorula glutinis* 細胞內所含的脂質，以 16 和 18 碳的脂肪酸為主，其中以油酸(C18:1)占 50~60%、棕櫚酸(C16:0)占 15~20%這兩種脂肪酸所占的比例最高，且類似植物油的組成，可作為替代性油料之來源。

不同碳源之影響

本次實驗探討不同碳源 (葡萄糖、純甘油、粗甘油) 對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。實驗結果如圖 4.1、表 4.1 所示，以粗甘油和葡萄糖為碳源有較高之菌體濃度，分別約為 5.4 g/l 及 5.1 g/l，其次是以純甘油為碳源，其菌體濃度為 4.3 g/l 之菌體濃度；在菌體累積油脂方面，則是以粗甘油為碳源有較高之油脂含量約占細胞乾重的 22.9%，之後依序為葡萄糖 (20.6%)、純甘油 (13.7%)。由本次實驗結果來看，其中比較意外的市以粗甘油當作碳源，不管是在 biomass 或是總油脂生產量都有不錯的結果，推測其可能原因為生質柴油在轉脂化過程中所殘留於粗甘油中的微量元素，可以加強細胞的生理功能而有助於細胞生長，使得菌體濃度較高。



不同碳源對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

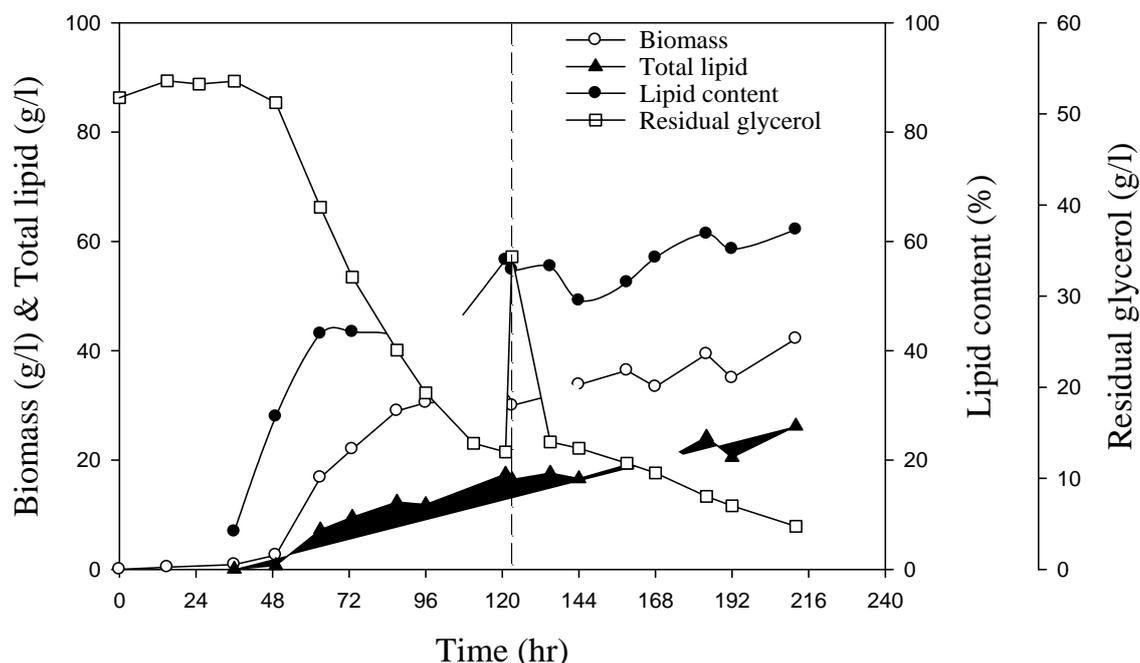
不同碳源對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響整理表格

Carbon source	Final pH	Residual glucose/glycerol (g/l)	Biomass (g/l)	Lipid content (%)	Total lipid (g/l)
Glucose	2.08 ± 0.02	8.95 ± 0.38	5.13 ± 0.58	20.60 ± 0.00	1.09 ± 0.13
Pure glycerol	2.27 ± 0.02	18.38 ± 0.19	4.27 ± 0.12	13.70 ± 0.02	0.57 ± 0.10
Crude glycerol	2.12 ± 0.04	7.29 ± 0.90	5.40 ± 0.35	22.90 ± 0.02	1.24 ± 0.17

三：桌上型發酵槽饋料批次實驗結果

由批次發酵結果發現起始碳源的濃度限制了 biomass 的生長濃度，因此為了提高菌體數量和增進油脂的累積，故採取饋料策略為控制饋料流速以維持碳源濃度，來探討此發酵策略對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。而饋料批次的起始濃度定為 140 g/l。

結果如下本實驗饋料時間點為 123 小時，以 250 g/l 粗甘油為饋料之碳源，是因為在第 121 小時後之菌體濃度已開始逐漸趨於平緩，因此推測菌體生長受到抑制，所以在第 123 小時開始饋料，希望可以藉由補充槽內碳源，同時稀釋抑制物，進而提高菌體濃度及油脂含量。實驗結果如圖可得知以碳源濃度提高後，與無饋料之批次發酵實驗相比的最大菌體濃度由 39.4 g/l 增加為 42.2 g/l；平均油脂含量由 57.75 ± 0.05 增為 $60.72 \pm 0.02\%$ ；最大油脂生產速率為 0.12 g/l/hr。由結果可知即使補充碳源也無法將菌體濃度及油脂含量有效提高，推測是當菌體消耗培養基達到一定程度後，會開始產生抑制菌體生長的不明物質，使得饋料後各方面產率皆無明顯增加，故後續實驗也不採用饋料批次程序。



發酵槽饋料批次程序對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

發酵槽饋料批次程序對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

Initial Crude-glycerol conc. (g/l)	Max. biomass (g/l)	Max. growth rate (g/l/hr)	Average lipid content (%)	Max. total lipids (g/l)	Yield* (g/g)	Max. lipid productivity (g/l/hr)
140	42.20	0.20	60.72 ± 0.02	26.23	0.50	0.12

*Lipid produced per glycerol consumed.

結論:

以 NTG 進行突變可有效且快速的篩選出總油脂濃度高達 60-70% 之紅酵母菌株 (6/100 株)，且以未經任何純化步驟的粗甘油當作碳源可以有效的取代昂貴的葡萄糖作為紅酵母生長與油脂累積使用，因此對於工業化生產紅酵母作為生質柴油之料源選項，具有相當大的意義。

出席國際學術會議心得報告

計畫編號：100-2221-E-029-012-

計畫名稱：利用尼羅紅篩選高油脂含量酵母菌 (Rhodotorula glutinis) 並進行高密度培養以作為生質柴油之油脂來源

出國人員姓名及職稱；顏宏偉

服務機關及單位：東海大學化材系

會議時間地點：12/14/2011-12/16/2011 韓國浦項 KAIST

會議名稱：The 2nd i_BioP Asia Symposium 2011

發表論文題目：Using Crude glycerol as the carbon source for the cultivation of oleaginous yeast-Rhodotorula glutinis under the irradiation conditions

心得報告：

一、參加會議經過

iBioP基本上是比较小型的研討會，參與人員限制在50名以內，包括亞洲五個國家，日本，韓國，中國，新加坡與台灣，各國的參與人員是由各國家的代表負責邀請，非邀請在列的人員是無法自行報名參加。本會議的主要旨在於讓亞洲區從事biorefinery相關研究人員有機會交流並互相認識，此次會議地點在於韓國浦項，由POSTECH負責籌辦，該校為韓國私立大學由浦項鋼鐵公司捐贈，因此研究經費相當充裕，對於研究人員而言算是一個相當理想的研究環境。

二、與會心得

這次得小型會議所發表的研究不算太多，其主要目的在於人員的認識與交流，相對於其他大型研討會而言，本會議更顯得其獨特。尤其參觀了POSTECH得實驗室後更讓人驚訝於韓國對於研發的投入，以及民族拼鬥性。不管事學生與教師對於研究的投入是相當令人驚訝，相對於台灣科研的前景不經有點憂慮。



Using crude glycerol as the carbon source for the cultivation of oleaginous yeast- *Rhodotorula glutinis* under the irradiation conditions

Hong-Wei Yen, Yi-Huan Yu

Tunghai University, Taichung, Taiwan

* Corresponding author. Tel: 886-4-23590262-209, Fax: 886-4-23690009,

E-mail: hwyen@thu.edu.tw

It is clear that fossil hydrocarbons are likely to become scarce and costly, methods to convert biomass to competitive liquid biofuels are increasingly attractive. Biodiesel production from various oil-containing sources is one of potential alternative biofuels, which is quite an attractive biofuel because of its biodegradable, nontoxic and renewable characteristics when converted from many different oil-containing sources, as well as its similar properties to conventional diesel fuels. However, production cost of biodiesel is not

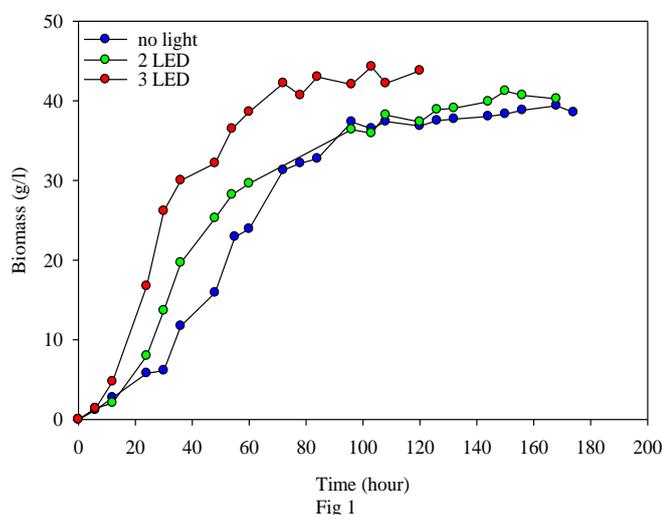


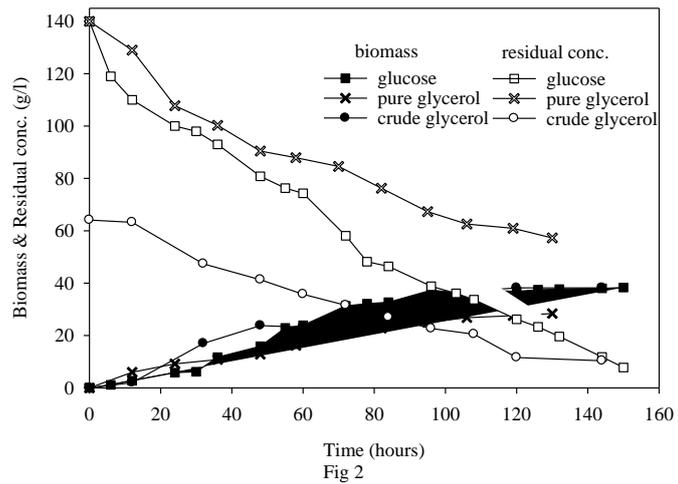
Fig 1

economically competitive as compared to traditional petroleum fuels, due to the relatively high cost of oil feedstock. If plant oils were used for biodiesel production, the cost of the oil-source has been estimated at 70–85% of the whole production cost. Besides the cost problem, the disputation of agricultural land usage for food or biofuels also impedes the development of biodiesel from agricultural crops. Therefore, biodiesel production using microbial lipids, named single cell oils (SCO), has attracted a great deal of attention in recent years. Microorganisms have often been considered for the production of oils and fats as an alternative to agricultural and animal sources. Normally, the microorganisms containing over 20% lipids are classified as oleaginous microorganisms. Among all oleaginous microorganisms, *Rhodotorula glutinis* has been regarded as a potential microbial oil producer. The authors had firstly found the irradiation could enhance the growth rate of non-photosynthetic *R. glutinis* (Fig 1). Even the mechanism of growth improved by irradiation in *R. glutinis* is not clear. The increase of β -carotene production by irradiation was considered to be one possible reason leading to the increase of growth rate by irradiation. To further reduce the cost of substrates, crude glycerol directly obtained from a biodiesel production plant (without any pretreatment in the lab) was adopted as the carbon source for the cultivation of *R. glutinis* as compared to the batch with glucose as the carbon source. Notably, glycerol is a

by-product of the biodiesel production process, estimated to be as high as 10% (w/w) of the output. It is estimated that, globally, nearly 11M tones of biodiesel will be manufactured. About 1.1 M tones of the glycerol by-product was produced in 2008. In this study, different colors of LED (blue, green, red and white) were used to find the effects of wavelength on the cells growth, and the potential of using crude glycerol as the carbon source was examined.

The results suggested that crude glycerol is an appropriate carbon source for the cultivation of *R. glutinis* as compared to the batch using glucose (Fig 2). Conversely, the batch with pure glycerol had the lowest biomass

among all batches. The reasons leading to the crude glycerol had the higher biomass than the batch with pure glycerol is not yet clear. It might come from the catalyst adding during transesterification process for biodiesel production, which contains some trace elements and contributes the enhancement of cells growth. The lipid contents in the batches with glucose, pure glycerol and crude



the
to

glycerol are $55.1 \pm 4.2\%$, $38.8 \pm 4.5\%$ and $44.1 \pm 2.6\%$ respectively. The results obtained in this study revealed that the crude glycerol had the great potential applied in the cultivation of *R. glutinis* for biodiesel production.

Keywords: *Crude glycerol, Total lipids, Biodiesel*

P-12	Veeresh Juturu (ICES, Singapore)	Functional over-expression of fungal xylanases in methylotrophic yeast <i>Pichia pastoris</i>
P-13	Hong-Wei Yen (Tunghai University, Taiwan)	Using crude glycerol as the carbon source for the cultivation of oleaginous yeast- <i>Rhodotorula glutinis</i> under the irradiation conditions
P-14	Myonghoon Moon (KAIST, Korea)	Growth and lipid accumulation of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> under various cultivation modes
P-15	Jin Chuan Wu (ICES, Singapore)	Significantly improved acid tolerance of <i>Lactobacillus pentosus</i> by Error-prone whole genome amplification
P-16	Won-Kun Park (KAIST, Korea)	Optimization of biodiesel production from microalgae <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (CC124)
P-17	Katsunori Yoshikawa (Osaka University, Japan)	Metabolic engineering using genome-scale metabolic model for improvement of photosynthetic bioproduction
P-18	Balaji Balagurunathan (ICES, Singapore)	Applications of genome scale metabolic models for bio-based chemicals production
P-19	Dong Ho Seong (Inha University, Korea)	Production and analysis of biodiesel from microalgae
P-20	Gursong Yoo (KAIST, Korea)	Lipid extraction from very wet microalgae via cell disruption using osmotic shock

POSTECH, 77 Cheongam-ro, Nam-gu, Pohang, Kyungbuk, Korea 790-784

Tel :+82-54-279-8650 Fax :+82-54-279-8659

Email : ibiop-2011@postech.ac.kr

<http://www.ibioinasia.com>

無研發成果推廣資料

100 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：顏宏偉		計畫編號：100-2221-E-029-012-					
計畫名稱：利用尼羅紅篩選高油脂含量酵母菌 (Rhodotorula glutinis) 並進行高密度培養以作為生質柴油之油脂來源							
成果項目		量化			單位	備註 (質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等)	
		實際已達成數 (被接受或已發表)	預期總達成數 (含實際已達成數)	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (本國籍)	碩士生	2	2	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	2	2	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (外國籍)	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>本計畫結果已發表於 SCI 期刊。</p>
--	--------------------------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

紅酵母之高油脂相當具有潛力可做為生質柴油之料源。