

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏宏偉博士

Advisor：Hong-Wei Yen, Ph.D.

探討以海水與粗甘油作為培養基對於高油脂酵母菌

*Rhodotorula glutinis* 之生長

The fermentation process development of *Rhodotorula glutinis*

by using seawater and crude glycerol

研究生：梁惟翔 撰

Graduate student：Wei-Siang Liang

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

## 中文摘要

*Rhodotorula glutinis* (BCRC 22360) 是一株可累積高油脂的酵母菌，其中不飽和脂肪酸所佔含量較高，適合作為製造生質柴油的料源。當生質柴油產量大幅提升的同時，亦會大量累積生質柴油副產物-粗甘油，因含未反應的脂肪酸、醇類及催化劑等被認定為有害物質，儘管粗甘油價格低廉但在精製過程中需要高成本且複雜的純化手續，因此尋找粗甘油的用途已成了全球研究的重點議題；在台灣每年工業用水需消耗掉約 16.6 億噸，工業用水急遽跳升，使台灣水資源面對更大的缺水風險，然而台灣四面環海，海水資源豐富，若能利用海水來代替淡水進行酵母菌培養，除了能降低製程成本外，也可以避免環境遭受破壞，具有永續發展的宏觀性。本研究使用粗甘油做為碳源並嘗試利用海水取代淡水進行培養，探討不同發酵策略對於 *R. glutinis* 生長之影響性。

在搖瓶實驗中，分別對培養基組成及環境因子進行探討，首先，在全海水的培養下，菌體濃度與脂質含量分別為 5.73 g/L、29.17%，初步得知 *R. glutinis* 可以生長於海水鹽度 35‰ 的環境中具有一定的耐受性；藉由兩階段溫度培養策略，在菌體濃度方面降低 18.60%，但在脂質累積的部分對比於控制組卻提高了約 1.61 倍，推測在較低溫的環境下微生物為了要適應而增加脂肪酸之生成；添加植物油實驗中，軟棕櫚油與廢棄食用油皆發現以 3% 的添加量效果最好，脂質累積方面與控制組相比分別提升了 1.19 倍與 1.21 倍；改變滅菌溫度策略，結果發現不滅菌條件下仍無法避免雜菌污染，而當滅菌溫度維持在 80°C 時，*R. glutinis* 的菌體與脂質濃度分別為 7.06 g/L、2.23 g/L，其滅菌效果與控制組(121°C)相當。

放大實驗中分成兩個部分探討，(1) 5 L 氣舉式發酵槽批次實驗中，藉由改變不同淡海水比例來探討最合適 *R. glutinis* 生長的環境，結果發現在添加 50 % 海水培養下，菌體濃度可達到 18.4 g/L，最大脂質濃度也可達 6.84 g/L，與使用 RO 蒸餾水培養比較下相差無幾；(2) 由搖瓶油脂添加實驗放大至 5 L 氣舉式發酵槽，考量成本與菌體生長方面添加廢食用油的表現比軟棕櫚油優異，而在 5 L 攪拌式發酵槽，可以發現廢食用油 3 % 的添加其菌量可達到 25.8 g/L、平均脂質含量為 50.61 %，對比 5 L 氣舉式發酵槽，其菌量可得 22.3 g/L、平均脂質含量為 37.54 %，兩發酵槽對比，5 L 攪拌式發酵槽對於菌量以及脂質方面效果皆較為出色。

關鍵字：海水、粗甘油、*R. glutinis*、廢棄食用油

## Abstract

*Rhodotorula glutinis* (BCRC 22360) is an oleaginous yeast that can accumulate high content of total lipid, which is suitable as a microbial oil producer for the production of oil feedstock converted to biodiesel. With oil price increasing, a large of crude glycerol accumulates as biodiesel productivity rising. Although the prices of waste crude glycerol was too low, waste crude glycerol refined to purify it by complicate and costly process. To find out a new usage of crude glycerol has become an important issue for global research. In Taiwan, 1.66 billion tons of freshwater are consumed annually in industry that faced with greater the risk of water shortages. However, Taiwan is an island state which have rich marine resources. Maybe the problem of limited freshwater resources can be solved by using seawater to cultivate *R. glutinis*. In this study, the effects of fermentation strategy on cell growth and lipid production in bioreactor by using crude glycerol as carbon source and seawater were investigated.

The effects of medium ingredients and environmental cultivation conditions on the growth of cell and the content of lipid in the shaker flask experiments. First, it was found that, the experiments by using seawater can lead to biomass of 5.73 g/L and lipid content 29.17 %. Preliminary result shows *R. glutinis* can grow in the environment of seawater ; The experiments by two stage control cause the reduction on biomass concentration but can improved by 1.61 times in lipid content, infer that in order to adapt low temperature cause lipid rapid accumulation. The experiments by

adding palm oil and waste cooking oil are found to 3% of the appropriate addition ; By reduce sterilization temperature in order to lower the cost. Non-sterile can't avoid contamination. But at 80°C sterilization, we can get the biomass of 7.06 g/L and total lipid of 2.23 g/L. From the results, 80°C sterilization can effective avoid contamination same as normal sterilization process (121°C).

Three parts were discussed in the trial of scale up experiment, including (1) In a 5L airlift bioreactor, the effects of environmental cultivation conditions on the total lipid production were evaluated by changing proportion of seawater. It was found that the addition of fifty percent seawater can lead to biomass of 18.4 g/L and the max total lipid of 6.84 g/L which is almost the same as the freshwater medium. (2) Production cost and growth of cell adding waste cooking oil is better than palm oil. The experiment of adding 3 % waste cooking oil was discussed that scaled up by using the 5 L stirred tank reactor and 5 L airlift. It was found that adding waste cooking oil can promote the growth of cell significantly, which could obtain 25.8 g/L of biomass and 50.61 % of lipid content by using 5 L stirred tank reactor. While getting 22.3 g/L of biomass and 37.54 % of lipid content by using 5 L airlift. Comparing the two reactors, 5 L stirred tank reactor was better than another one.

Keywords: *Rhodotorula glutinis* 、 seawater 、 crude glycerol 、 waste cooking oil

## 謝誌

首先誠摯的感謝指導教授 顏宏偉老師，在這兩年來的敦敦教誨與教導，指點我研究實驗的正確方向，啟發我獨立思考與解決問題的能力，並適時地予以鼓勵，使我在求學生涯中受益匪淺，在此謹致上由衷的謝意。感謝成大化工所 張嘉修教授、元智生科所 魏毓宏教授、元智化材所 藍祺偉教授，於口試期間所給予的指導與寶貴的建議，才能使得本論文更臻充實，在此致上最誠摯的謝意。

在研究所的求學過程中，感謝學長 國智、昭翰、景綸、子翔、榮駿、俊嘉；學姐 于婷、品妏在研究上的指導與照顧，另外感謝同學 晉安、威仁、適任、舜緯、志淵的相互扶持與勉勵，實驗室裡有你們好歡樂，這些點點滴滴的回憶銘記在心。另外感謝在我研究所兩年生涯曾經給予我協助的老師以及同學，感謝有你們讓我的生活多采多姿。最後，謹將此論文獻給我的父母親及家人，感謝他們無盡的付出，以及在精神上的支持與鼓勵，才可以讓我在求學階段無後顧之憂的進行研究，謝謝你們！

## 目錄

中文摘要 .....	I
Abstract.....	III
謝誌 .....	V
目錄 .....	VI
圖目錄 .....	XI
表目錄 .....	XIII
第一章 緒論 .....	1
第二章 文獻回顧 .....	2
2.1 生質柴油.....	2
2.2 生質柴油副產物-粗甘油(Crude glycerol).....	3
2.3 產油微生物.....	5
2.4 粘紅酵母菌( <i>Rhodotorula glutinis</i> )簡介.....	7
2.5 影響微生物油脂產量因子.....	8
2.5.1 溫度.....	8
2.5.2 pH 值.....	8
2.5.3 碳源和氮源.....	9
2.5.4 碳源.....	9
2.5.5 氮源.....	9

2.5.6 無機鹽和微量元素.....	10
2.6 產油機制.....	11
2.7 海水.....	14
2.8 棕櫚油.....	16
2.9 廢棄食用油.....	17
2.10 發酵策略.....	18
2.10.1 批次發酵策略.....	18
2.10.2 饋料發酵策略.....	18
2.10.3 兩段式培養策略.....	18
第三章 材料與分析方法 .....	19
3.1 實驗材料.....	19
3.1.1 實驗酵母菌株.....	19
3.1.2 實驗藥品.....	20
3.1.3 實驗海水.....	21
3.1.4 實驗廢棄食用油.....	21
3.2 實驗儀器.....	22
3.3 分析方法.....	24
3.3.1 菌體濃度分析方法.....	24



3.3.2	總脂質濃度分析方法.....	24
3.3.3	甘油分析方法.....	25
3.3.4	鹽度分析方法.....	25
3.3.5	滲透壓分析方法.....	25
3.3.6	生質柴油組成分析.....	25
3.4	實驗方法.....	27
3.4.1	原始菌種保存.....	27
3.4.2	培養基組成.....	27
3.4.3	接菌.....	28
3.5	實驗架構.....	29
3.6	實驗培養條件.....	30
3.6.1	搖瓶批次發酵程序 (Flask Experiments) .....	30
3.6.2	5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序 .....	33
3.6.3	5 L 攪拌式發酵槽批次發酵程序 .....	35
3.6.4	50 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序 .....	36
3.7	實驗裝置圖.....	37
3.7.1	搖瓶發酵培養裝置圖 (250 ml).....	37
3.7.2	5 L 氣舉式發酵槽批次發酵培養裝置圖 .....	37

3.7.3 5 L 攪拌式發酵槽批次發酵培養裝置圖 .....	38
3.7.4 50 L 氣舉式發酵槽饋料批次培養裝置圖 .....	38
第四章 結果與討論 .....	39
4.1 搖瓶批次發酵程序 (Flask Experiments) .....	39
4.1.1 不同比例海水之影響.....	39
4.1.2 移除培養基中鹽類之生長影響.....	41
4.1.3 添加油品於海水培養下之影響.....	43
4.1.4 滅菌溫度之影響.....	47
4.1.5 兩階段溫度培養策略.....	49
4.2 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序 .....	51
4.2.1 不同海水比例影響.....	51
4.2.2 80°C 滅菌下影響.....	54
4.2.3 添加 3 % 軟棕櫚油、1 g/L Tween 80 之影響 .....	56
4.2.4 添加 3 % 廢棄食用油、1 g/L Tween 80 之影響 .....	58
4.3 5 L 氣舉式反應器之添加油品綜合探討 .....	61
4.4 5 L 攪拌式發酵槽批次發酵程序 .....	65
4.4.1 添加 3 % 廢棄食用油、1 g/L Tween 80 之影響 .....	65
4.5 50 L 氣舉式發酵槽發酵程序 .....	69

第五章 結論與未來展望 .....	72
5.1 結論.....	72
5.2 未來展望.....	74
附錄 .....	75
附錄 A.....	75
參考文獻 .....	76
作者簡歷 .....	80

## 圖目錄

圖 2-1 檸檬酸代謝循環圖(Ratledge, 2004) .....	12
圖 2-2 脂肪酸的累積機制(Ratledge, 2004) .....	12
圖 2-3 脂肪酸和 TAG 生物合成途徑(Liang and Jiang, 2013) .....	13
圖 3-1 <i>Rhodotorula glutinis</i> 在 agar plate 上之外觀 .....	19
圖 3-2 搖瓶實驗裝置圖 .....	37
圖 3-3 5 L 氣舉式發酵槽裝置圖 .....	37
圖 3-4 5 L 攪拌式發酵槽裝置圖 .....	38
圖 3-5 50 L 氣舉式發酵槽裝置圖 .....	38
圖 4-1 改變不同比例海水作為溶劑培養 48 hr，探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響 .	40
圖 4-2 移除培養基中鹽類培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響 .....	42
圖 4-3 改變添加棕櫚油濃度，培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響 ...	44
圖 4-4 改變添加廢食用油濃度，培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響	46
圖 4-5 不同滅菌溫度，培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響 (溫度- Non-sterilized、60°C、80°C 與 120°C) .....	48
圖 4-6 兩階段溫度培養策略，培養 72 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響 (溫度	

-control (24°C)、18°C after 48hr、18°C after 63hr).....	50
圖 4-7 改變不同比例海水(0%、50%、75%、100%)作為溶劑之菌體濃度比較 .....	52
圖 4-8 改變不同比例海水(0%、50%、75%、100%)作為溶劑之脂質累積比較 .....	52
圖 4-9 在 80°C 滅菌下與控制組之菌體濃度比較圖 .....	55
圖 4-10 在 80°C 滅菌下與控制組之脂質累積濃度比較圖 .....	55
圖 4-11 添加軟棕櫚油 3% 之菌體濃度比較圖 .....	56
圖 4-12 添加軟棕櫚油 3% 之脂質累積比較圖 .....	57
圖 4-13 添加廢棄食用油 3% 之菌體濃度比較圖 .....	59
圖 4-14 添加廢棄食用油 3% 之脂質累積比較圖 .....	59
圖 4-15 添加廢棄食用油 3% 之菌體濃度比較圖 .....	66
圖 4-16 添加廢棄食用油 3% 之脂質累積比較圖 .....	66
圖 4-17 添加廢棄食用油 3% -5 L 攪拌式發酵槽 v.s.5 L 氣舉式發酵槽之菌體濃 度比較圖.....	67
圖 4-18 添加廢棄食用油 3% -5 L 攪拌式發酵槽 v.s.5 L 氣舉式發酵槽之脂質累 積比較圖.....	67
圖 4-19 50L 氣舉式發酵槽-添加廢棄食用油 3% .....	70

## 表目錄

表 2-1	粗甘油微量元素分析表(Thompson and He, 2006).....	4
表 2-2	Oil content of some microorganisms (Meng et al, 2009).....	6
表 2-3	Lipid composition of some microorganisms (Meng et al, 2009).....	6
表 2-4	Average concentrations of the major ions in seawater(Morris and Riley, 1966) .....	15
表 3-1	實驗藥品清單 .....	20
表 3-2	實驗儀器清單 .....	22
表 3-3	種子培養基 .....	27
表 3-4	發酵培養基 .....	28
表 4-1	改變不同比例海水(100%、75%、50%、25%、0%)作為溶劑 培養 48 hr， 並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響之實驗數據 .....	40
表 4-2	移除培養基中鹽類培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之實驗數據 ...	42
表 4-3	改變添加棕櫚油濃度，培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之實驗數據 .....	44
表 4-4	改變添加廢食用濃度，培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之實驗數據 .....	46
表 4-5	不同滅菌溫度，培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響 (溫度-	

Non-sterilized、60°C、80°C與 121°C) 之實驗數據 .....	48
表 4-6 兩階段溫度培養策略，培養 72 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響 (溫度-control (24°C)、18°C after 48hr、18°C after 63hr) 之實驗數據.....	50
表 4-7 5L 氣舉式發酵槽，改變不同比例海水(100 %、75 %、50 %、0 %)作為溶劑，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之實驗數據.....	53
表 4-8 5L 氣舉式發酵槽，以海水作為溶劑在 80°C 滅菌之動力學參數變化.....	55
表 4-9 5 L 氣舉式發酵槽添加 3 % 軟棕櫚油之動力學參數變化 .....	57
表 4-10 5 L 氣舉式發酵槽添加 3% 廢棄食用油之動力學參數變化 .....	60
表 4-11 5 L 氣舉式反應器之添加油品綜合比較.....	63
表 4-12 各油品脂肪酸組成 .....	63
表 4-13 各油品價格 .....	64
表 4-14 各生質柴油之脂肪酸組成 .....	64
表 4-15 5 L 攪拌式發酵槽添加 3% 廢棄食用油之動力學參數變化 .....	68
表 4-16 添加廢棄食用油 3 % -5 L 攪拌式發酵槽 v.s.5 L 氣舉式發酵槽之動力學參數變化.....	68
表 4-17 50L 氣舉式發酵槽-添加廢棄食用油 3 % .....	70
表 4-18 累積油脂之發酵槽實驗與文獻之比較 .....	71

## 第一章 緒論

近年來由於全球產業提升，工業大量開發，導致了石化能源日益耗竭，二氧化碳大量排放，不僅在經濟上受到原油價格波動的影響，以及造成海平面上升、全球暖化等環境破壞，迫使各國皆面臨開發新能源以及能源永續系統的新技術挑戰。在眾多替代能源中，生質能源方面 *Rhodotorula glutinis* 是一株可累積高油脂的酵母菌，由於細胞生長速度快，且其中不飽和脂肪酸所佔的含量高，油脂成分類似於植物油(以 C16:0 與 C18:1 為主)，因此具有相當高發展潛力，適合作為生質柴油生產之替代性油料的來源。隨著工業區大量開發，工業用水急遽跳升，在台灣每年工業用水需消耗掉約 16.6 億噸，且地下水抽用量的 20% 中有 6.3 億噸是屬於超抽的地下水，因此造成不可回復的地層下陷，然而台灣四面環海，海水資源相當豐富，為了有效降低成本，使用海水來代替淡水進行酵母菌培養，除了能降低抽取淡水成本外，也可以避免地層下陷造成環境破壞，更具有資源永續發展的宏觀性。

若能以生質柴油的副產物粗甘油作為產油微生物的碳源，不但可以解決轉化成高附加價值產品的成本問題也達到環境保護之目的；而在 *R. glutinis* 培養的過程中，海水的鹽度會影響 *R. glutinis* 生長及油脂累積含量，如果海水裡鹽度太高，會抑制菌體生長及油脂累積，但淡水比例太高會增加製程成本，因此海水比例的探討值得深入研究。



## 第二章 文獻回顧

### 2.1 生質柴油

隨著全球石化燃料需求量增加，能耗的急劇增長最終也導致更多溫室氣體產生和更多環境問題，石油危機所造成的價格波動與環保意識高漲下，為了減輕環境污染與經濟效益，生質柴油是目前取代石化柴油為目標的替代能源(Hajjari et al, 2017)。

生質柴油屬於再生能源的一種，舉凡向日葵油、大豆油、棕櫚油等植物油或是由炸過後的廢棄食用油都可以作為生質柴油的原料，經轉酯化反應、中和、水洗以及蒸餾等過程所生成，具有生物可分解和無毒等特性，可直接代替石化柴油或混合石化柴油使用，是一種符合環保訴求的綠色能源，可有效降低柴油機動車所造成的廢氣污染。但是傳統生質柴油料源若使用植物油會造成與民爭食、土地限制及氣候等窘境，為了解決上述問題，現今發展至第三代生質燃料(Alaswad et al, 2015)，雖然目前利用微生物產油的成本較植物油高，但經由改善製程方法可大幅度提升微生物產油過程，除此之外，也不受到氣候的影響，且含油微生物的生命週期短而在適當條件下可以產生高達總細胞重 60% 的脂質。含油酵母菌或黴菌所合成的多不飽脂肪酸非常相似植物油，使含油微生物有利於作為的生物柴油產業原料(Easterling et al, 2009)。

## 2.2 生質柴油副產物-粗甘油(Crude glycerol)

近年來化石燃料替代能源—生質柴油之高度開發與推廣，以極快的速度在市場上嶄露頭角，歐洲估計目前生質柴油年產量超過 950 萬噸(Hejna et al, 2016)，預計 2020 年將超過 1500 萬噸，由於每噸的生質柴油將生成總產量 10%的甘油副產物，此舉將間接導致甘油的過度生產與蓄積。

儘管粗甘油價格低廉，但在處理的難度造成顯著的環境問題，為了能有效重複利用，可將粗甘油進行純化處理，然而經轉酯化反應後的甘油相中含有甲醇、氫氧化鈉、低量的硫化合物、蛋白質及礦物質等，使得純化的每個步驟亦不可避免需要花費成本，再浪費更多相關處置費用來轉換成更高價值產品前，開發粗甘油的新用途是我們迫切需要的。

為了能更有效利用粗甘油，有許多方法創新粗甘油的用途，如燃燒、堆肥、動物飼料補給、熱化學轉化。其中，作為餵養家畜補充的研究上顯示添加粗製甘油高達 30 % 左右，可以取代乾物質且對於攝取量及副作用沒有任何明顯的影響。此外，有研究發現，甘油的代謝對消化能的比例類似於玉米或大豆油(Lammers et al, 2008)，並且粗甘油的營養成分相似於玉米殼，可以取代家畜飲食中的可發酵澱粉的 10 %，而目前的售價為市場上一半的價格，如此一來成了一個具有吸引力的選擇。此外，有文獻指出，粗甘油作為 *Rhodospiridium toruloides* 發酵培養基的碳源，所得到的脂質含量比純甘油作為發酵碳源高出 19.7 %，顯示出粗甘油所含的微量元素對於生物體有正面的影響性(Gao et al, 2016)，表 2-1 是分析經由不同的料源製成生質柴油，所得到粗甘油的內容物。

將粗甘油運用在微生物發酵工程上，不僅減少純化的程序，也降低了環境上的破壞，更能有效廢物利用，在生質柴油的生產上更加有利可圖，目前粗甘油也

作為碳源用於生產高價值化合物，如 1,3-丙二醇(Hiremath et al, 2011)，甘露醇(Onishi and Suzuki ,1970)，檸檬酸(Rymowicz et al, 2008)和海藻糖。

表 2-1 粗甘油微量元素分析表(Thompson and He, 2006)

Feedstock	Rapeseed	Canola	Soybean	Crambe
Calcium (ppm)	24	19.7	11.0	163.3
Potassium (ppm)	BDL	BDL	BDL	216.7
Magnesium (ppm)	4.0	5.4	6.8	126.7
Phosphorous (ppm)	65.0	58.7	53.0	136.7
Sulfur (ppm)	21.0	14.0	BDL	128.0
Sodium (%wt)	1.06	1.07	1.20	1.10
Carbon (%wt)	25.3	26.3	26.0	24.0
Nitrogen (%wt)	0.05	0.05	0.04	0.06

\*BDL：表示低於檢測分析方法的相應極限值。

### 2.3 產油微生物

微生物生產的油脂又稱為單細胞油 (single cell oils, SCOs)，相較於動植物油脂，單細胞油具有下列優點：(1)微生物生長週期短，不受季節氣候的影響；(2)無資源枯竭、與糧食競爭或素食者不便的疑慮；(3)利用培養機組成或生長條件之調控，可誘導菌種產生特定組成的油脂並提高產量。因此運用微生物生產生質柴油或機能性油脂的技術日益受到重視(Meng et al, 2009)。

產油微生物 (oleaginous microorganisms)定義為菌體含油量佔生物量比例達 20 % 以上之微生物，菌體油脂含量甚至可達 70 % 以上，於微藻、酵母與真菌皆有產油菌株被發現(Liang and Jiang, 2013)，微生物油脂累積量與組成如表 2-2、表 2-3，產油真菌之中，產油酵母是最早受到矚目的類群，近年來許多研究是利用微生物油脂作為生物柴油的生產原料，其優勢在於油脂轉化後，其組成接近現有生質柴油之規格，可利用多樣之有機廢棄物為培養基質，助於環保並降低生產成本(Chi et al, 2011)。

由於產油微生物可利用廢物有機物來產生脂質的能力，能在多種培養條件下生長進行工業規模開發與發展，目前產油微生物已成為獲取高附加價值脂肪酸，如  $\gamma$ -次亞麻油酸(GLA)、花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA)與二十二碳六烯酸(DHA)等的重要原料(Leman, 2009)。

表 2-2 Oil content of some microorganisms (Meng 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

表 2-3 Lipid composition of some microorganisms (Meng 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	-

## 2.4 粘紅酵母菌(*Rhodotorula glutinis*)簡介

*Rhodotorula glutinis* 屬於紅酵母菌之一，也屬於腐生菌一類，抗逆性強，廣泛分布於各種生態中。*Rhodotorula glutinis* 細胞型態成圓形或卵圓形，菌落為紅色，行無性多邊出芽繁殖，是一種好氧性菌體，並廣泛的分佈在各種生態中，適合生長在 20~30 °C，pH5~6 的環境。

*R. glutinis* 以三酸甘油酯(TGA)形式來產生脂質，其菌體所累積的油脂中不飽和脂肪酸所佔的含量高達 72 % 以上，脂肪酸組成主要以油酸(C18：1)占 50~60 %、棕櫚酸(C16：0)占 20~30 %和亞油酸(C18：2)占 5~25 %，且類似於植物油，因此適合作為製造生質柴油的料源。

由於 *R. glutinis* 的單細胞有較快的生長速度以及能利用低成本發酵培養基的特色，並且能利用便宜的農業原料或廢棄物來獲得微生物油，例如：酒廠廢水 (Schneider et al, 2013)、粗甘油(Saenge et al, 2011)、甜菜糖蜜(Taskin et al, 2016)、澱粉廢水等，大大地增加生產經濟成本效益和廢棄物處理問題，對於未來能源發展具有相當大的潛力。

## 2.5 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）與相對氮源（peptone、硫酸銨等）受到限制的條件下，才能更有效的產生並儲存油脂於細胞中。因此，微生物成長與累積脂質受到培養基中碳氮比和其他因素，如溫度、pH、無機鹽與微量元素等影響。

### 2.5.1 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，當 *R. glutinis* 培養基溫度控制在 30°C 時，培養 45 小時前可增加油脂的含量，而之後調低生長溫度在室溫 25°C，可再進一步提升其累積量，但當溫度高於 35°C 時，不利 *R. glutinis* 的生長，而溫度低於 20°C，菌體生長速率則會趨向遲緩(Zhang and Tan, 2014)，因此必須視菌體最佳的培養溫度而定。

### 2.5.2 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，*R. glutinis* 在偏酸性的環境下，能獲得較高的油脂含量(Johnson et al, 1992)。

### 2.5.3 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重的碳源和氮源，影響著微生物生理狀態的程度更直接。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，微生物不再增加菌量，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酵母菌是使其達到高產油量的關鍵。

### 2.5.4 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。碳源可提供細胞良好的生長，但是濃度過高時會對菌體有抑制情形出現，因為濃度高時期培養基的滲透壓也較高。據文獻指出，選擇利用生質柴油工廠的副產物粗甘油或木質纖維素之水解糖化液作為碳源，對 *R. glutinis* 生產油脂及類胡蘿蔔素來進行探討(Yen et al, 2012)，可以有效降低生產成本和解決與民爭時與人爭地的問題。

### 2.5.5 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。



### 2.5.6 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 $\omega$ -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。根據文獻指出，培養基中的碳磷比（C/P），會直接影響到 *R. toruloides* 累積脂質的含量(Wu et al, 2010)。

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。

## 2.6 產油機制

微生物油脂蓄積的生化機制，其主要過程為：當氮源受到限制的條件下，微生物細胞內 AMP deaminase 活性上升，隨著 AMP deaminase 活性上升，細胞內與粒線體中的 AMP 濃度下降。粒線體內三羧酸循環(tricarboxylic acid cycle)中的異檸檬酸脫氫酶(isocitrate dehydrogenase)受到 AMP 濃度下降也跟著停止運作，異檸檬酸脫氫酶的停止造成 isocitrate 無法被代謝而藉著 Aconitase 與 citric acid 達成平衡，因此 citrate 得以累積於粒線體內。

接著檸檬酸在經檸檬酸-蘋果酸轉位酶(citrate-malate translocase)穿過粒線體細胞膜而輸送至細胞質中，再由 ATP : citrate lyase 分解產生了 acetyl-CoA 及草醋酸(oxaloacetate)，而 acetyl-CoA 為生成脂肪酸合成酵素所需的前驅物，這一部分為油脂合成反應之控制步驟，並且是由長鏈脂肪酸(fatty acetyl-CoA esters)來回饋控制。

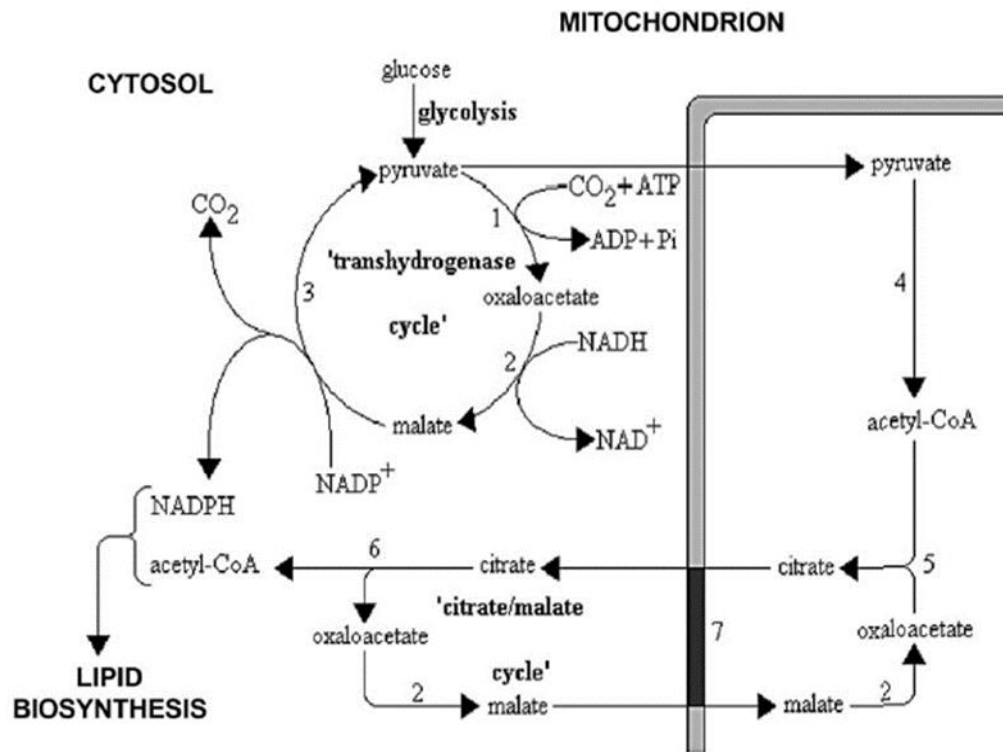


圖 2-1 檸檬酸代謝循環圖(Ratledge, 2004)

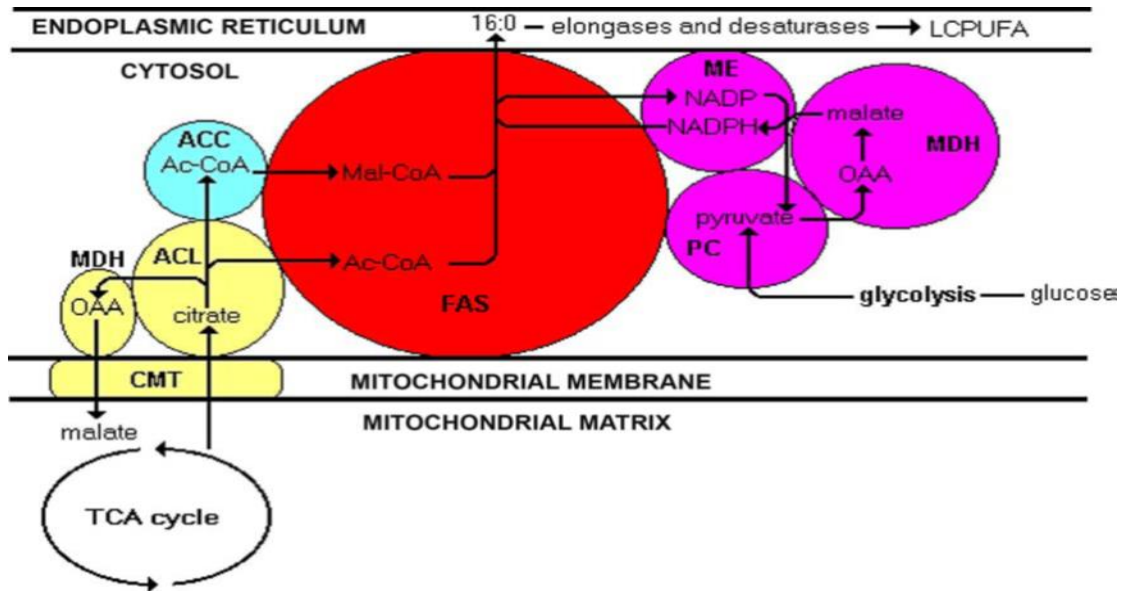


圖 2-2 脂肪酸的累積機制(Ratledge, 2004)

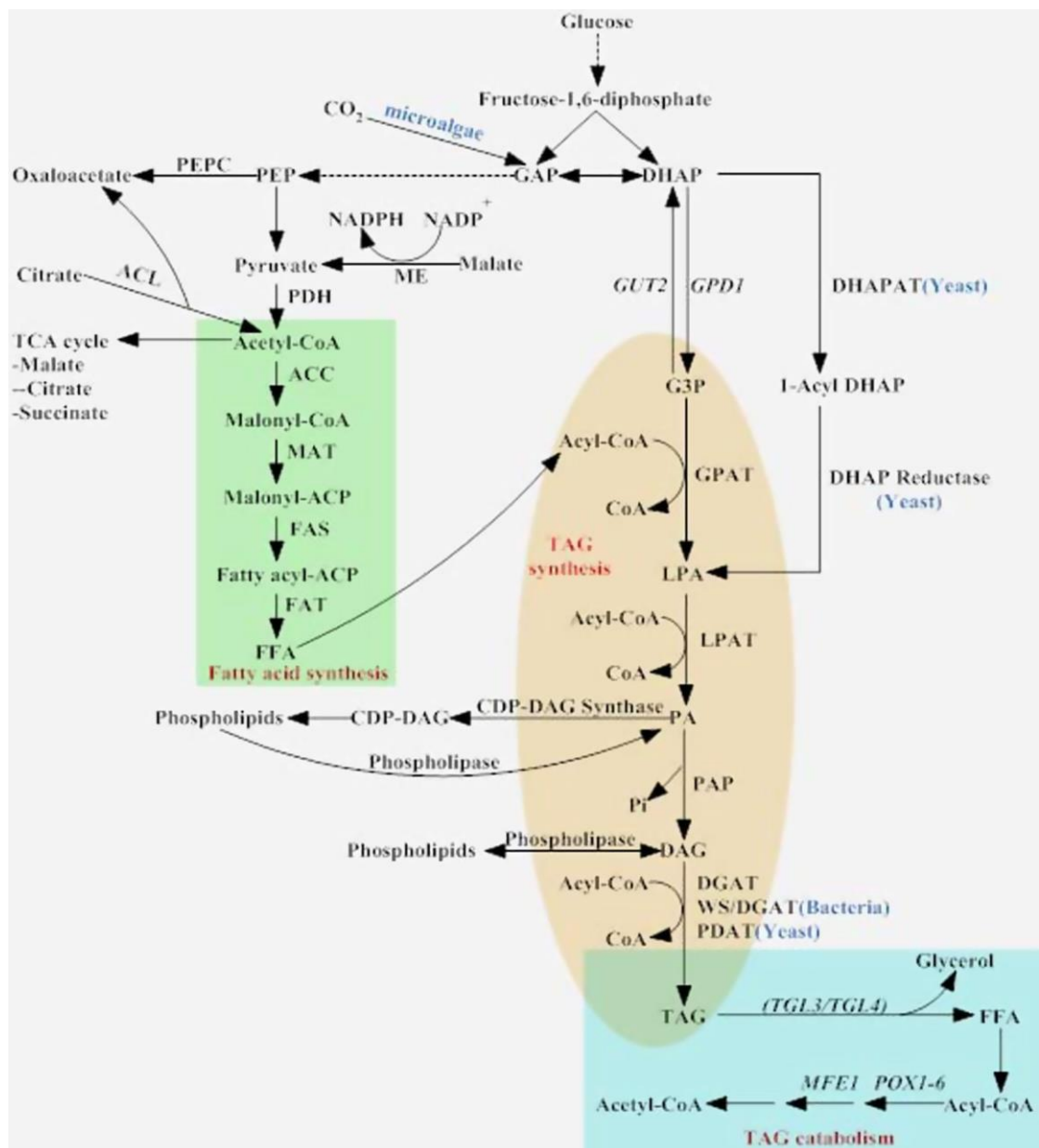


圖 2-3 脂肪酸和 TAG 生物合成途徑(Liang and Jiang, 2013)

## 2.7 海水

地球上陸地面積占全球的 29%，而海洋所占高達 71%，其中全球水資源部分海水也占了 97%。台灣四面環海，但由於地狹人稠、山坡陡峭、河流短促，大部分的雨水會迅速沿著河川流向大海，蓄水不易，所以有效的利用有限的水資源一直是台灣必須重視的環境問題。

目前已被發現海水化學物質及元素有 92 種，其中 11 種（氯、鈉、鎂、硫、鈣、鉀、溴、鋇、硼、碳、氟）占海水溶解物質總量的 99.8%，其它含量甚微；目前可以從海水中提取 60 多種化學物質。海洋生物所需的元素取自海水，如表 2-4，碳、鉀、硫等元素；氮、磷、矽等元素，能滿足生物的需要，也是生物必需的營養元素。根據文獻指出，利用海水培養 *Rhodotorula glutinis* 可以有效增加其菌體量和類紅蘿蔔素的產量，可由 12 g/L 和 70 mg/L 提升至 16 g/L 和 86 mg/L(Bhosale and Gadre, 2001)。

表 2-4 Average concentrations of the major ions in seawater(Morris and Riley, 1966)

ion	‰ by weight
Chloride, Cl <sup>-</sup>	18.980
Sulphate, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2.649
Bicarbonate, *HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.140
Bromide, Br <sup>-</sup>	0.065
Borate, H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.026
Fluoride, F <sup>-</sup>	0.001
Sodium, Na <sup>+</sup>	10.556
Magnesium, Mg <sup>2+</sup>	1.272
Calcium, Ca <sup>2+</sup>	0.400
Potassium, K <sup>+</sup>	0.380
Strontium, Sr <sup>2+</sup>	0.013
Overall total salinity	34.482

## 2.8 棕櫚油

棕櫚油(Palm oil)來自油棕樹上的棕果中提取出來的，主要來源是非洲油料棕櫚，它原產於熱帶非洲，亦產於中美洲、馬來西亞、印度尼西亞等地。其主要產地為馬來西亞和印度尼西亞是全球主要的棕櫚油生產國，這兩個國家的棕櫚油產量佔全球產量的 80% 以上。棕櫚果由外果皮、中果皮(成熟的中果皮又稱果肉)、內果皮和果核仁組成。由果肉壓榨出來的油稱棕櫚油(Palm oil)，由果核仁壓榨出來的油稱棕櫚仁(核)油(Palm Kernel oil)。兩種油的成分大不相同，棕櫚油主要含有棕櫚酸(C 16)和油酸(C 18)兩種最普通的脂肪酸，其飽和程度約為 50 %;棕櫚仁油主要含有月桂酸(C 12)，其飽和程度達 80 % 以上。而棕櫚油中含有胡蘿蔔素，因此顏色較深，其成分包括 43% 的飽和脂肪酸、43% 的單元不飽和脂肪酸和 13% 的多元不飽和脂肪酸，並含有豐富的維生素 K 和其他元素(O'Brien, 2009)。

而硬棕櫚油及軟棕櫚油，是以不同的加工程度來區分。精緻棕櫚油經過了不同溫度控制的分餾處理後才區分為精緻軟棕(RBD palm oil stearin)及精緻硬棕(RBD palm stearin)，兩者最大差別在熔點的不同以及油酸含量的不同(Cukalovic et al, 2013)。

## 2.9 廢棄食用油

廢食用油為可資源化之廢棄物，倘任意棄置，將造成水溝阻塞、產生惡臭及孳生蚊蟲，廢棄油也會造成水質和土壤污染，進而產生更大的生態影響、污染路面等環境衛生及公共安全問題(Hussain et al, 2016)。

目前台灣廢食用油年產量約 7 至 8 萬噸當其作為生質柴油料源，但若未經過蒸餾精製將無法去除雜質，有可能會殘留在生質柴油中，造成滋生細菌產生污泥，而發生油管及濾網堵塞、熄火等問題；而且廢食用油與高酸油中含有大量的游離脂肪酸(FFA)，無法直接以一般鹼製程製造生質柴油，需經由前處理將其酸價降至一定值。

如何去化這龐大廢油數量，由於廢食用油含有少量的水份、澱粉、蛋白質、皂化物、聚合物、食物碎屑等雜質，而產油酵母具有將油脂轉為脂肪酸的能力，有文獻指出藉由額外添加廢食用油提升了 *Yarrowia lipolytica* 菌體濃度，並且將廢棄食用油轉為有經濟效益的脂肪酸(Bial et al, 2011)。



## 2.10 發酵策略

### 2.10.1 批次發酵策略

批次發酵是最普遍用於各類發酵產品上，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，但也因為對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，被視為必要之程序。

### 2.10.2 饋料發酵策略

饋料發酵(fed-batch)是指在批次發酵過程中，間歇或連續地加入培養基的方法，是一種介於批次與連續式發酵的過度發酵方式。饋料是生物程序中最普遍的補料方式，是用來調整在發酵反應器中基質或產物濃度。而饋料批次的優點，在於可以有效避免基質或產物所造成的抑制現象，且可以有效的提升生產速率。但因為在發酵期間連續或間歇性饋料，所以工作體積會持續增加至反應器體積上限。

### 2.10.3 兩段式培養策略

兩段式培養策略在於第一階段：細胞生長期(Growth phase)時，提供細胞成長所適合的環境，如溶氧量、pH、溫度、氮碳源等，已大幅縮短菌體數量達對數其最高峰，穩定成長之後，即將進入第二階段：脂肪酸合成期(Production phase)，利用饋料或改變操作參數，如碳氮比、溶氧、溫度等方法，來快速提高微生物油脂含量(Lorenz et al, 2017)。

### 第三章 材料與分析方法

#### 3.1 實驗材料

##### 3.1.1 實驗酵母菌株

本實驗所採用的菌株 *Rhodotorula glutinis*，是購自生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center)，菌種編號：BCRC 22360。屬紅酵母菌之一，也屬於腐生菌的一類，在外觀上，細胞的型態呈卵圓形，菌落為紅色，如圖 3-1 所示。



圖 3-1 *Rhodotorula glutinis* 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
工業級粗甘油	Crude glycerol	又華股份有限公司
甘油	Glycerol	SHOWA
YM BROTH	Yeast Malt Broth	ST BIO
酵母萃取物	Yeast extract	DIFCO BD
硫酸銨	Ammonium sulfate	SHOWA
硫酸鎂	Magnesium sulfate heptahydrate	SHOWA
磷酸二氫鉀	Potassium dihydrogen phosphate	SHOWA
氯化鈣	Calcium dichloride dehydrate	聯工化學試藥
氯化鈉	Sodium chloride	SHOWA
鹽酸	Hydrochloric acid	AENCORE
硫酸	Sulfuric acid	Scharlau
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	SHOWA
甲醇	Methanol	ECHO

氯仿	Chloroform	Seedchem
界面活性劑	Tween80	BBI
軟棕櫚油	Palm oil	順億化工有限公司
大豆沙拉油	Soybean salad oil	台糖
乙腈	Acetonitrile	ECHO
乙酸乙酯	Ethyl acetate	ECHO
異丙醇	Propan-2-ol	ECHO
正己烷	n-Hexane	ECHO
廢棄食用油	Waste cooking oil	井滋味滋日式小館

---

### 3.1.3 實驗海水

本實驗海水取於彰化沿岸海水，滲透壓約在 930 至 830 mmol/kg 間，鹽度約落在 32 至 35 psu，使用前利用沉澱過濾法將較大的砂石與雜質移除。

### 3.1.4 實驗廢棄食用油

本實驗廢棄食用油種類來源為大豆油，是從大豆中提取的植物性油脂，脂肪酸組成含量為棕櫚酸 6-8 %、油酸 25-36 %、硬脂酸 3-5 %、亞油酸 52-65 %、花生酸 0.4-0.1 %、亞麻酸 2.0-3.0 %，脂肪酸以不飽和居多，大豆油中另含有豐富的磷脂和維生素。

### 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
磁石攪拌加熱器	CORNING	PC-420D
pH 計	INSPECTED	PL-700PV
高壓蒸氣滅菌釜	TRIDENT	EA635
無菌操作台	HIGH TEN	3BH-24
恆溫震盪培養箱	LIAN SHEN	LUS-150
高壓蒸氣滅菌釜	TRIDENT	EA635
超純水機	RODA	
5 公升氣舉式發酵槽	Biotop	
5 公升攪拌式發酵槽	Biotop	
50 公升氣舉式發酵槽	Biotop	
高效液相層析儀 UV detector	Hitachi	L-2400
高效液相層析儀 RI detector	Hitachi	RI 5450
高效液相層析儀 Pump	Hitachi	L-2130/ 5110

高效液相層析儀 Auto Sampler	Hitachi	L-2200/ 5210
紅外線水分蒸發儀	IR 35	DENVER INSTRUMENT
微電腦分光光度計	Thermo	GENESYS 10UV
高速中型離心機	Hettich	Universal-32R
數位型離心機	HSIANTAI	CN-2200
葡萄糖分析儀	YSI	2300STAT
冷凍乾燥機	PAN CHUM	CT-series
Air compressors	SWAN	DR Series
Vacuums pump	EDWARDS	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
大扭力直流攪拌機	SHIN KWANG	DC-1S
氣相層析儀	Thermo	Focus GC
鹽度計	Salinity refractometer	ATAGO
滲透壓儀	Vapor Pressure Osmometer	Wescor model 5600

---

### 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)。

#### 3.3.2 總脂質濃度分析方法

秤取冷凍乾燥後的菌體 50 mg，加入甲醇/氯仿(1:2)溶液 5 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 5，作用時間 2 min)，然後靜置萃取 1 hr。再經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min。收集上層萃取液於已秤重之鋁皿，再將殘留於離心管之細胞再次加入 3 ml 甲醇/氯仿溶液萃取至無色，最後將所有萃取液於鋁皿且放入 60°C 烘箱烘乾 48 hr，由鋁皿前後之重量差後可得脂質量。利用測得的脂質量除以秤取的菌體量，可求得單位菌量下所含有的脂質量，即為脂質的含量(%，w/w，Lipid content)，將脂質的含量乘上菌體濃度(g/L，Biomass)，即可計算出總脂質的濃度(g/L，Total lipid)

### 3.3.3 甘油分析方法

取 10 ml 發酵液，以轉速 7000 rpm 離心 10 min，取上清液並稀釋 10 倍，以 0.45  $\mu$ m 針筒過濾器過濾。

利用 HPLC (Hitachi RI detector 5450, Hitachi pump 5110, Hitachi Auto Sampler 5210, Hitachi High-Technology Corporation, Japan) 分析甘油濃度，分析條件：管柱 C18 (Vercopak N5ODS, 250 mm  $\times$  4.6 mm, Taiwan)，移動相為 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，流速 0.4 mL/min，注射量 50  $\mu$ L。

### 3.3.4 鹽度分析方法

取出 5 ml 菌液，在轉速 7000 rpm 下離心 10 min，取上清液利用鹽度計 (Master-BX/S28M, ATAGO) 量測鹽度。

### 3.3.5 滲透壓分析方法

將菌液置入離心管中，用離心機以轉速 7000 rpm 下離心 10 min，分離菌體和上清液，取上清液後，利用 Vapor Pressure Osmometer (Wescor model 5600) 測量來讀取數值。

### 3.3.6 生質柴油組成分析

抽取上層生質柴油樣本，加入硫酸鈉至過飽和除水，以 700 rpm 離心固液分離後，進行 GC 分析。稱取 50 mg 的十七酸甲酯作為內標物並用正己烷定量至 5 ml，濃度為 10 mg/ml。精秤生質柴油樣本 50 mg 加入十七酸甲酯標準品 1 ml，取生質柴油/十七酸甲酯混和溶液 1  $\mu$ l 注入 GC 分析。層析管柱為 Column InertCap FFAP (I.D. 0.25mm, Length 30m, df 0.25  $\mu$ m)；管柱起始溫度：150°C，30 s；第一次升溫速率：10°C/min 至 180°C；第二次升溫速率：1.5°C/min 至 198°C；



最終溫度維持在 198°C，3 min。偵測器為 flame ionization detector (FID)，注射口與偵測器溫度分別為 250 與 280°C。以下列公式計算脂肪酸甲酯 (FAME) 含量：

$$C = \frac{\sum A - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100\%$$

$\sum A$ ：C16 至 C18:3 脂肪酸甲酯所有波峰之面積總合；

$A_{EI}$ ：內標物十七烷酸甲酯之波峰面積；

$C_{EI}$ ：內標物十七烷酸甲酯之濃度(mg/ml)；

$V_{EI}$ ：內標物十七烷酸甲酯之體積(ml)；

$m$ ：樣本所精秤之質量(mg)。

### 3.4 實驗方法

#### 3.4.1 原始菌種保存

將購自菌種中心的 *Rhodotorula glutinis* 之冷凍乾燥管，接至 YM BROTH (Yeast Malt Broth) 液態培養基活化，並放入恆溫培養箱中以 24°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，即為 Yeast Malt Broth (YM BROTH)，並以 1 N HCl 調整 pH 值為 5.5

表 3-3 種子培養基

Compounds	Concentration (g/L)
Yeast extract	3.0
Malt extract	3.0
Peptone	5.0
Dextrose	10.0

### 3.4.2.2 搖瓶發酵培養基 (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。

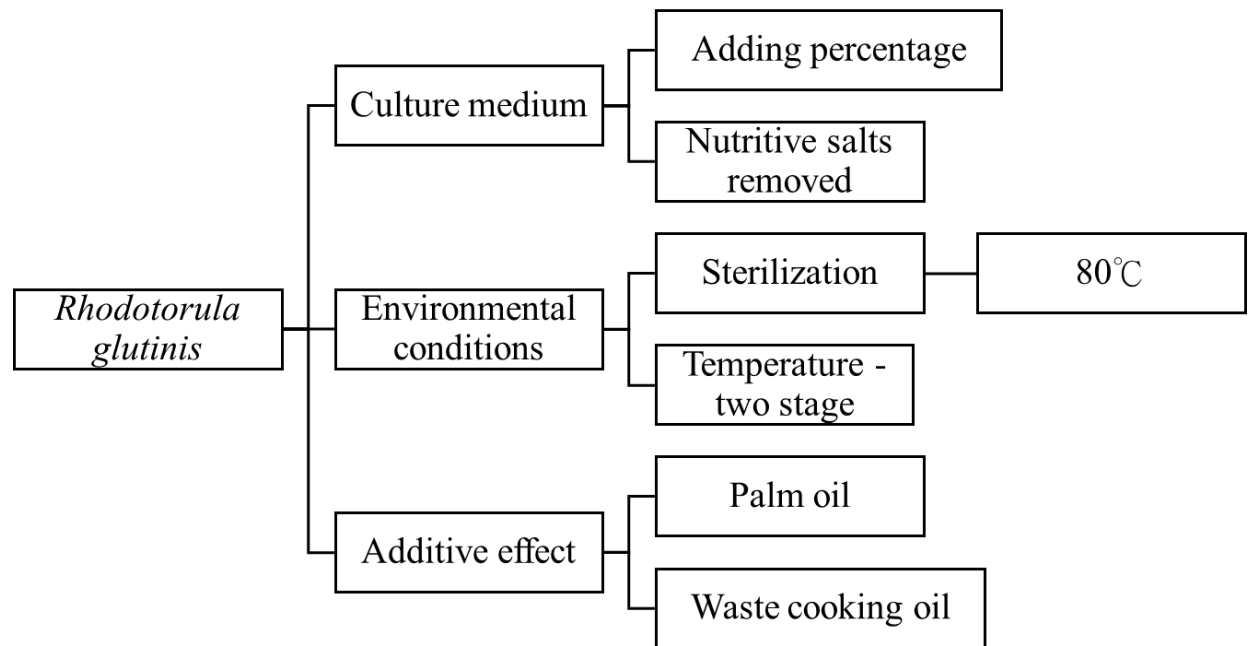
表 3-4 發酵培養基

Compounds	Concentration(g/L)
Crude glycerol	60.0
Yeast extract	2.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5
CaCl <sub>2</sub>	0.1

### 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 stirred tank 部分之接菌量為 Fermentation medium 10%之體積，50 L airlift 部分之接菌量為 Fermentation medium 1%之體積。

### 3.5 實驗架構



### 3.6 實驗培養條件

#### 3.6.1 搖瓶批次發酵程序 (Flask Experiments)

##### 3.6.1.1 改變海水含量培養基之影響

目的：探討使用不同比例的海水對於菌體生長與脂質累積之影響。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 分別以不同比例海水(100%、75%、50%、25%、0%)，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 48 hr。

##### 3.6.1.2 探討滅菌溫度於海水培養下之影響

目的：探討利用海水作為溶劑改變滅菌溫度對於菌體生長與脂質累積之影響。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以海水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。
3. 滅菌溫度分別為(Non-sterilized、60°C、80°C 與 121°C)
4. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
5. 於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 48 hr。

### 3.6.1.3 利用海水並移除培養基中無機鹽類之生長影響

目的：探討把培養基中無機鹽類移除，只利用海水本身所富含的礦物質對於菌體生長與脂質累積之影響。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以海水作為溶劑，並使用表 3-4 中的 Crude glycerol、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  與 Yeast extract 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 48 hr。

### 3.6.1.4 添加油品於海水培養下之影響

#### I. 添加不同濃度棕櫚油之影響

目的：探討不同濃度下的軟棕櫚油對菌體生長及脂質累積之影響。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以海水為溶劑，依照表 3-4 配置 50 ml 培養基，並分別在培養基中額外添加不同濃度的軟棕櫚油(0.5 %、1 %、3 %、5 %)。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於溫度 24°C 培養箱中，轉速 150 rpm，培養 48 hr。

## II. 添加不同濃度廢棄食用油之影響

目的:探討不同濃度下的廢棄食用油對菌體生長及脂質累積之影響。

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以海水為溶劑，依照表 3-4 配置 50 ml 培養基，並分別在培養基中添加不同濃度的軟棕櫚油(0.5 %、1 %、3 %、5 %)。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於溫度 24°C 培養箱中，轉速 150 rpm，培養 48 hr。

### 3.6.1.5 兩階段溫度培養策略

目的:探討於生長期間改變溫度對菌體生長及脂質累積之影響。

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以海水為溶劑，依照表 3-4 配置 50 ml 培養基。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中，轉速 150 rpm，培養 72 hr。
4. 起始培養溫度為 24°C，發酵期間於不同時間點改變溫度至 18°C。

### 3.6.2 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序

#### 3.6.2.1 改變海水含量之影響

目的：探討使用不同比例的海水並放大成 5 L 氣舉式發酵槽對於菌體生長與脂質累積之影響。

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 分別以不同含量海水(100%、75%、50%)，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. 調控 pH5.5，溫度 24 °C，通氣量 1.5 vvm 下進行培養，每 15 hr 及 9 hr 取樣。

#### 3.6.2.2 利用海水並在 80°C 滅菌下之影響

目的：探討利用海水為溶劑並在 80°C 滅菌下對於菌體生長與脂質累積之影響。

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以海水為溶劑，依照表 3-4 置成 5000 ml 培養基
3. 於 80°C 滅菌完成後以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 調控 pH5.5，溫度 24 °C，通氣量 1.5 vvm 下進行培養，每 15 hr 及 9 hr 取樣。



### 3.6.2.3 添加 3 % 軟棕櫚油、1 g/L Tween 80 之影響

目的: 探討 3 % 軟棕櫚油、1 g/L Tween 80 添加放大至 5 L 氣舉式發酵槽，對於菌體生長及脂質累積之影響。

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以海水為溶劑，依照表 3-4 配置並在其中添加 3 % 的軟棕櫚油配置成 5000 ml 培養基
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 調控 pH5.5，溫度 24 °C，通氣量 1.5 vvm 下進行培養，每 15 hr 及 9 hr 取樣。

### 3.6.2.4 添加 3 % 廢棄食用油、1 g/L Tween 80 之影響

目的: 探討 3 % 廢棄食用油、1 g/L Tween 80 添加放大至 5 L 氣舉式發酵槽，對於菌體生長及脂質累積之影響

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以海水為溶劑，依照表 3-4 配置並在其中添加 3 % 的廢棄食用油配置成 5000 ml 培養基
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 調控 pH5.5，溫度 24 °C，通氣量 1.5 vvm 下進行培養，每 15 hr 及 9 hr 取樣。

### 3.6.3 5 L 攪拌式發酵槽批次發酵程序

#### 3.6.3.1 添加 3 % 廢棄食用油、1 g/L Tween 80 之影響

目的: 探討 3 % 廢棄食用油、1 g/L Tween 80 添加放大至 5 L 攪拌式發酵槽，對於菌體生長及脂質累積之影響

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以海水為溶劑，依照表 3-4 配置並在其中添加 3 % 的廢棄食用油配置成 5000 ml 培養基
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 調控 pH5.5，溫度 24 °C，溶氧量 30 %，通氣量 1 vvm 下進行培養，每 15 hr 及 9 hr 取樣。

### 3.6.4 50 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序

#### 3.6.4.1 添加 3 % 廢棄食用油、1 g/L Tween 80 之影響

目的: 探討 3 % 廢棄食用油、1 g/L Tween 80 添加放大至 50 L 氣舉式發酵槽，對於菌體生長及脂質累積之影響

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以海水為溶劑，依照表 3-4 配置並在其中添加 3 % 的廢棄食用油配置成 50000 ml 培養基
3. 以 1 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 調控 pH5.5，溫度 24 °C，通氣量 1.5 vvm 下進行培養，每 15 hr 及 9 hr 取樣。

### 3.7 實驗裝置圖

#### 3.7.1 搖瓶發酵培養裝置圖 (250 ml)

本實驗所使用 250 ml shaker flask，實際工作體積 50 ml。



圖 3-2 搖瓶實驗裝置圖

#### 3.7.2 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵培養裝置圖

本實驗所使用氣舉式發酵槽，實際發酵體積為 5 L。



圖 3-3 5 L 氣舉式發酵槽裝置圖

### 3.7.3 5 L 攪拌式發酵槽批次發酵培養裝置圖

本實驗所使用 5 L 攪拌式發酵槽，槽體高 34.8 cm；槽體外徑長 23.4 cm；槽體內徑長 16.9 cm；攪拌葉片直徑 8.5 cm，實際發酵體積 3 L。



圖 3-4 5 L 攪拌式發酵槽裝置圖

### 3.7.4 50 L 氣舉式發酵槽饋料批次培養裝置圖

本實驗所使用 50 L 氣舉式發酵槽高度為 102.6 cm，外管直徑 32.0 cm，內管直徑 25.7 cm，套管長 52.7 cm，套管直徑 8.5 cm，實際發酵體積為 40 L。



圖 3-5 50 L 氣舉式發酵槽裝置圖

## 第四章 結果與討論

### 4.1 搖瓶批次發酵程序 (Flask Experiments)

隨著工業區大量開發，用水急遽跳升，大量的消耗地下水也因此對環境造成不可回復的破壞，使台灣的水資源面對更大的風險；由於台灣四面環海，海水資源相當豐富，所以本實驗利用西部沿岸海水所富含的礦物質對於 *R. glutinis* 做簡單的探討。為了能有效提升菌體濃度與脂質累積，本實驗使用搖瓶培養 *Rhodotorula glutinis*，分成兩大部分探討對菌體濃度與脂質含量的影響：(1)改變培養基及(2)環境因子。

#### 4.1.1 不同比例海水之影響

利用海水進行酵母菌的培養，首要遇到的問題就是鹽度，故本實驗探討添加不同濃度的海水來確定 *R. glutinis* 可以耐受的程度。實驗結果如圖 4-1，隨著海水比例的增加，菌體濃度從 RO 蒸餾水培養的 7.10 g/L 逐漸降低至全海水培養的 5.73 g/L，這部分推測海水本身的鹽度造成高滲透壓環境，所以在海水比例增加時菌體濃度部分略為下降；在脂質累積的部分，其含量分別為 31.75 %、23.64 %、25.69 %、27.99 %、29.17 %，由此發現全海水的使用也不影響 *R. glutinis* 的脂質生成。

結論，已確定 *R. glutinis* 可以生長於海水鹽度 35‰的環境中，可得知菌體具有一定的耐受度，但考量未來用於工業發酵製成中，高滲透壓會讓整體環境不利於菌體生長，減緩 *R. glutinis* 的生產速率導致成本提高，所以該如何得到最合適的淡水比例後續將放大實驗來探討。

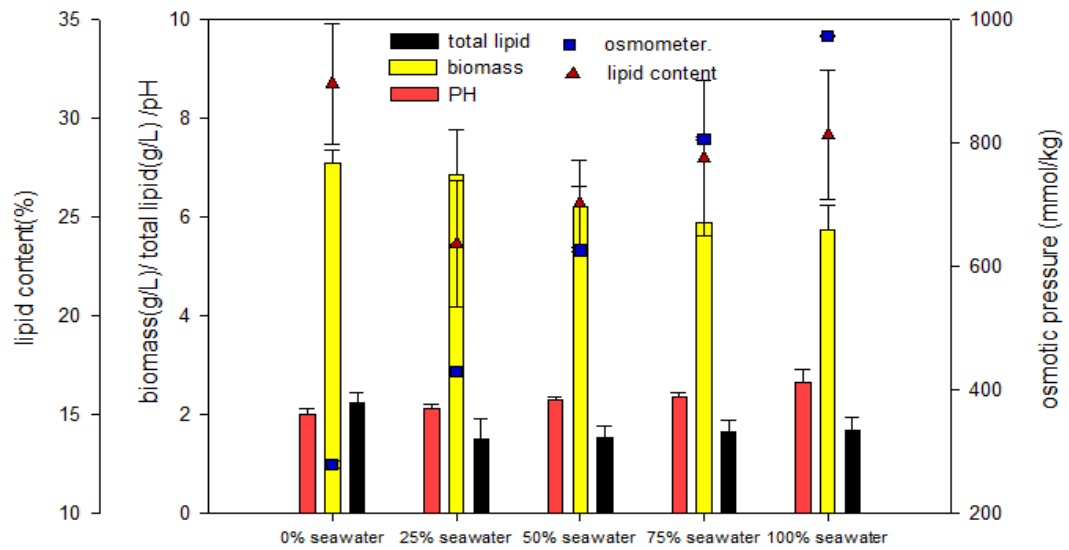


圖 4-1 改變不同比例海水作為溶劑培養 48 hr，探討對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-1 改變不同比例海水(100%、75%、50%、25%、0%)作為溶劑 培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長影響之實驗數據

Based-medium	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	Osmometer (mmol/kg)
RO water	2.01 ± 0.13	7.10 ± 0.26	31.75 ± 3.07	2.25 ± 0.20	280.0 ± 5.65
25% seawater	2.11 ± 0.11	6.85 ± 0.92	23.64 ± 3.22	1.50 ± 0.40	429 ± 4.24
50% seawater	2.30 ± 0.06	6.20 ± 0.42	25.69 ± 2.21	1.53 ± 0.23	626.5 ± 3.53
75% seawater	2.35 ± 0.10	5.90 ± 0.00	27.99 ± 3.94	1.65 ± 0.23	807 ± 2.83
100% seawater	2.65 ± 0.27	5.73 ± 0.50	29.17 ± 3.27	1.67 ± 0.26	937.5 ± 0.70

#### 4.1.2 移除培養基中鹽類之生長影響

海水經由雨水沖刷岩石及溶解大氣中的二氧化碳等因而富含許多礦物質，在前述實驗中，已確定高鹽度環境會抑制菌體生長，為了減輕培養成本與降低滲透壓，故本實驗嘗試直接利用海水中的無機鹽類而不額外添加微量元素來培養 *Rhodotorula glutinis*。實驗結果如圖 4-2，結果顯示移除培養基微量元素的菌體濃度為 5.73 g/L，與控制組的 5.53 g/L 相比，因降低了培養環境中鹽度而略有提升；脂質累積的部分，其含量分別為 21.37 % 與 21.33 %。

由此能發現 *R. glutinis* 在培養基中少了大部分的無機鹽和微量元素仍可從海水中攝取，然而搖瓶培養基中所需的無機鹽類是微量的，將來必須進行放大實驗，來驗證單靠海水中的營養源進行培養是具有可行性的。



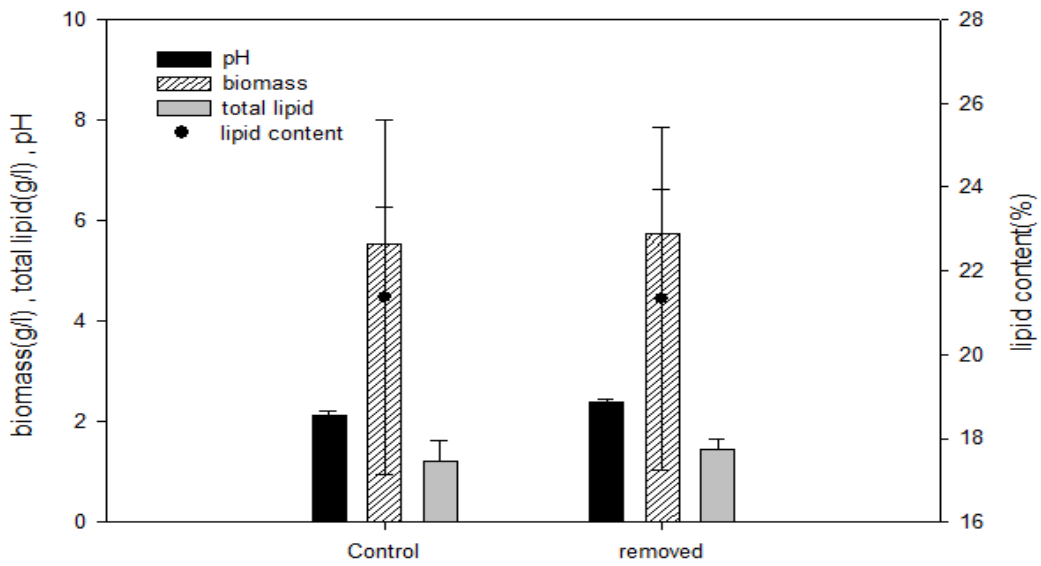


圖 4-2 移除培養基中鹽類培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-2 移除培養基中鹽類培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之實驗數據

Based-medium	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)
Control	2.21 ± 0.10	5.53 ± 0.75	21.37 ± 4.24	1.20 ± 0.40
Removed	2.37 ± 0.06	5.73 ± 0.89	21.33 ± 4.08	1.44 ± 0.22

### 4.1.3 添加油品於海水培養下之影響

有文獻指出在培養基中加入油脂，由於油脂中含有特定脂肪酸，可以扮演基質或前驅物來合成新的脂肪酸(Certik et al, 1999)；另外也有文獻指出利用 *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確實有其正面效益。

#### I. 不同濃度之棕櫚油影響

培養基中添加市面上常見之油類(軟棕櫚油、玄米油、大豆沙拉油、橄欖油、芥花油、葵花油)，對 *R. glutinis* 而言以軟棕櫚油為最佳選擇(蘇國治, 2016)，故本實驗選用軟棕櫚油進行添加，探討不同添加濃度(0.5 %、1 %、3 %、5 %)對於 *R. glutinis* 的生長以及脂質累積之影響。

實驗結果如圖 4-3，菌量隨著添加濃度提高而有所提高，在 3 % 之後開始趨於平緩，猜測是過多的油脂在液面或菌體表面形成油膜，降低氧傳效果而影響了菌體生長，而脂質含量在添加量 3 % 時達到最高，故認為 3% 為最佳的添加濃度，菌體濃度以及脂質含量分別達到 7.27 g/L、34.82 %，對比於控制組，分別提高了約 27 % 的菌量以及 5.65 % 脂質含量，後續將以 3 % 的濃度添加量放大至 5 L 氣舉式發酵槽進行實驗。

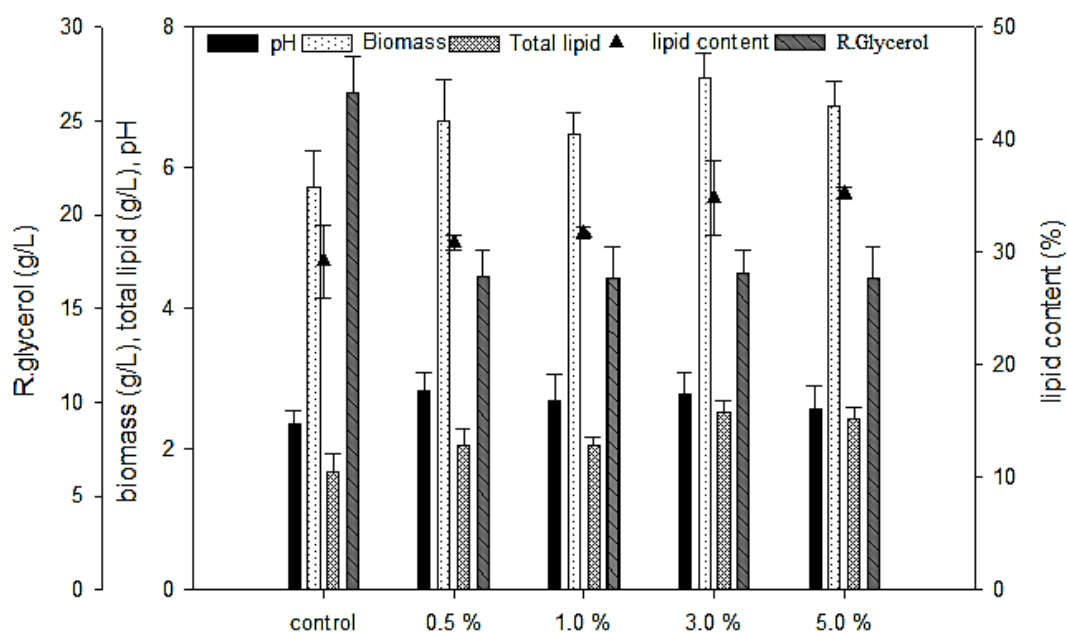


圖 4-3 改變添加棕櫚油濃度，培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-3 改變添加棕櫚油濃度，培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之實驗數據

Palm oil (%)	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	R.glycerol (g/L)
0.5	2.82 ± 0.25	6.66 ± 0.57	30.88 ± 0.65	2.06 ± 0.21	16.71 ± 1.43
1	2.69 ± 0.37	6.46 ± 0.30	31.73 ± 0.48	2.06 ± 0.10	16.57 ± 1.72
3	2.78 ± 0.31	7.27 ± 0.35	34.82 ± 3.28	2.52 ± 0.17	16.84 ± 1.23
5	2.57 ± 0.33	6.86 ± 0.35	35.24 ± 0.55	2.42 ± 0.16	16.57 ± 1.71
control	2.65 ± 0.27	5.73 ± 0.50	29.17 ± 3.27	1.67 ± 0.26	26.49 ± 1.90

## II. 添加不同濃度廢棄食用油之影響

廢棄食用油為可資源化之廢棄物，目前台灣廢食用油年產量約 7 至 8 萬噸當其作為生質柴油料源，由於廢食用油含有大量的游離脂肪酸(FFA)，無法直接以一般鹼製程製造生質柴油，需經由前處理將其酸價降至一定值。廢食油含有少量澱粉、蛋白質、聚合物、食物碎屑等雜質，有文獻指出藉由額外添加廢食用油可提升 *Yarrowia lipolytica* 菌體濃度，另外利用產油酵母可將廢食用油轉為有經濟效益的脂肪酸 (Bialy et al, 2011)。故本實驗選用廢棄食用油進行添加，探討不同添加濃度(0.5 %、1 %、3 %、5 %)對於 *R. glutinis* 的生長以及脂質累積之影響，

市面上有許多種類的廢棄烹飪油，它們所含的飽和及多不飽和脂肪酸比例皆不一樣，本實驗使用廢食油總類為大豆油，脂肪酸以不飽和居多。實驗結果如圖 4-4，在脂質累積的部分在 3 % 之後開始趨於平緩，5 % 添加量對比於控制組提高了約 1.25 倍；在菌體生長部分雖然添加廢食用油確實對菌體生長有正面效益，菌體濃度由控制組的 6.10 g/L 逐漸提升至 5 % 添加量的 6.90 g/L，但考量過多油脂會覆蓋液面形成油膜降低氧傳效率，後續將以 3 % 的濃度添加放大至 5 L 攪氣舉式與攪拌式發酵槽進行實驗。

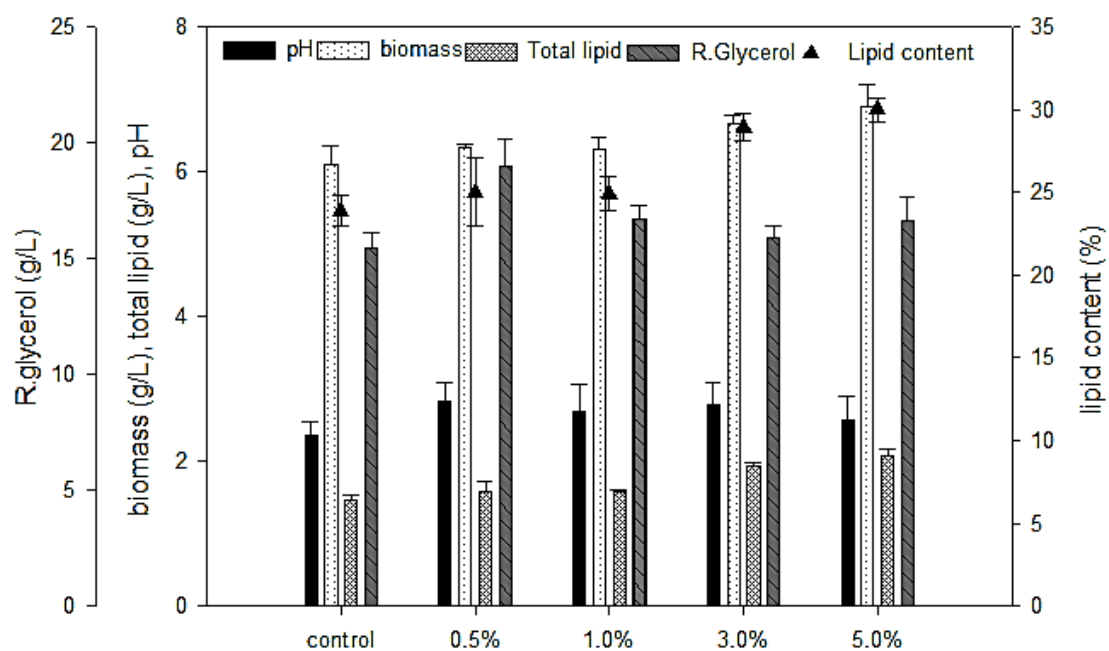


圖 4-4 改變添加廢食用油濃度，培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-4 改變添加廢食用濃度，培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之實驗數據

Waste cooking oil (%)	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	R.glycerol (g/L)
0.5	2.41 ± 0.02	6.33 ± 0.05	24.99 ± 2.06	1.58 ± 0.14	19.01 ± 1.11
1	2.51 ± 0.05	6.30 ± 0.17	24.92 ± 1.02	1.58 ± 0.10	16.73 ± 0.58
3	2.66 ± 0.12	6.66 ± 0.11	28.94 ± 0.86	1.93 ± 0.05	15.89 ± 0.54
5	2.60 ± 0.07	6.90 ± 0.30	30.00 ± 0.70	2.07 ± 0.10	16.64 ± 1.01
control	2.38 ± 0.09	6.10 ± 0.26	23.88 ± 0.94	1.45 ± 0.07	15.44 ± 0.66

#### 4.1.4 滅菌溫度之影響

在發酵工程中，滅菌是一道必要且無法避免的過程，滅菌過程中一般會利用高壓以及高溫蒸氣來進行，隨著工業化的槽體放大，這將會大大提高生產成本，且一般用高壓蒸氣殺菌釜的加熱方式，其設定溫度在 121°C，導致培養基曝露在高溫之時間過久，培養液養份容易被破壞導致構成物的分解劣化。本實驗嘗試利用海水本身的高鹽度不利雜菌生長的特性，來探討降低滅菌溫度來培養 *R. glutinis* 之可行性。

實驗結果如圖 4-5，在不滅菌的狀況下，仍無法完全避免染雜菌體，而當滅菌溫度到達 80°C 時，*R. glutinis* 的菌體濃度以及脂質含量分別為 7.06 g/L、31.64 %，對比於控制組(121°C) 6.66 g/L、33.25 % 差異不大，推測由於不同微生物有其能適應不同酸鹼值範圍，海水本身 pH 約 8.3 左右為弱鹼性，在實驗中降低酸鹼值至酸性環境(pH 5.5)讓原本在海水中微生物的酵素活性降低，並且高鹽度環境下可以抑制大多數雜菌增生，利用 *R. glutinis* 可在酸性環境中生長與對海水具有一定的耐受度，使其他雜菌無法與其競爭，因此滅菌溫度只需要達到 80°C 即可達到減少耗能降低成本的程序。

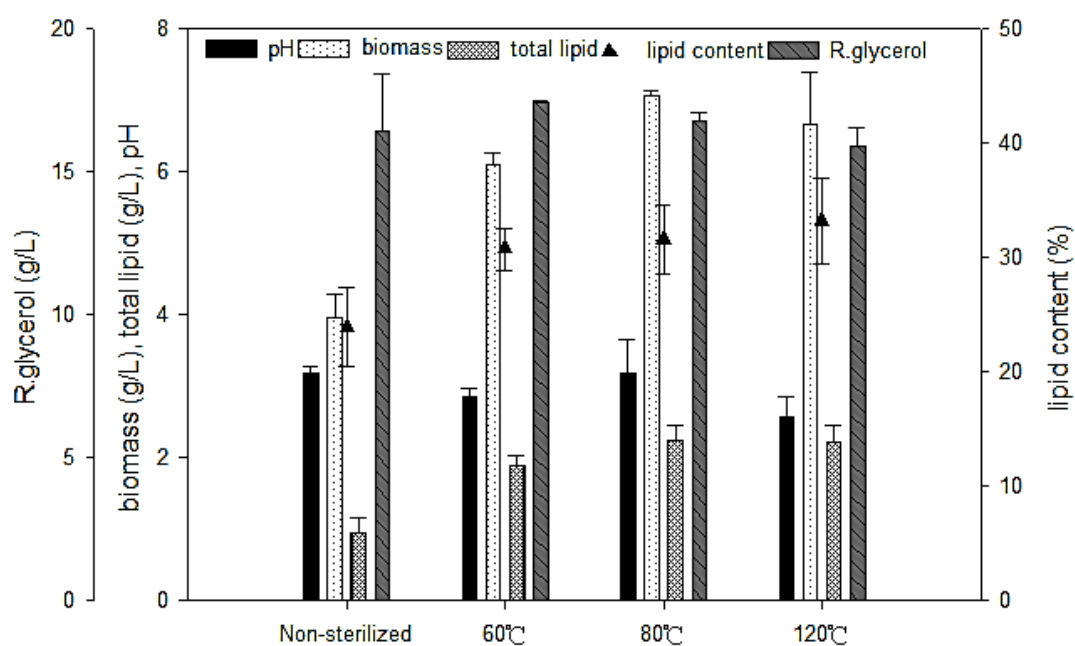


圖 4-5 不同滅菌溫度，培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長影響 (溫度-Non-sterilized、60°C、80°C 與 120°C)

表 4-5 不同滅菌溫度，培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長影響 (溫度-Non-sterilized、60°C、80°C 與 121°C) 之實驗數據

Based-medium	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	R.glycerol (g/L)
Non-sterilized	3.17 ± 0.10	3.96 ± 0.32	23.93 ± 3.50	0.95 ± 0.20	16.40 ± 2.01
60°C	2.85 ± 0.12	6.10 ± 0.17	30.76 ± 1.84	1.88 ± 0.16	17.43 ± 0.08
80°C	3.18 ± 0.48	7.06 ± 0.05	31.64 ± 2.99	2.23 ± 0.22	16.77 ± 0.28
121°C	2.56 ± 0.28	6.66 ± 0.72	33.25 ± 3.75	2.20 ± 0.23	15.88 ± 0.67

#### 4.1.5 兩階段溫度培養策略

文獻指出，提高培養溫度可促進細胞生長速率，而在低溫脅迫下有利於提高脂肪酸累積量(Zhang and Tan , 2014)，由前人研究可知當溫度高於 35°C 時不利 *R. glutinis* 生長，而溫度低於 20°C 卻會導致生長速率遲緩，因此本實驗將初始培養溫度訂為 24°C，在不同時間點降低溫度至 18°C 來探討 *R. glutinis* 生長及脂質累積之影響。

實驗結果如圖 4-6 所示，當培養溫度持續維持在 24°C 時，可獲得較高的菌體濃度 8.60 g/L，與文獻結果相符，而當培養 63hr 時降低溫度，在脂質累積的部分對比於控制組提高了約 1.61 倍，但菌體濃度卻降低了 18.60 %，推測在較低溫的環境下，微生物為了要適應而增加脂肪酸之生成。因此，初步認為可利用兩段式培養策略，於第一階段細胞生長期(Growth phase)時提高培養溫度，使菌體數量達對數其最高峰，再於第二階段脂肪酸合成期(Production phase)提供較低溫的環境，來快速提高脂肪酸含量。



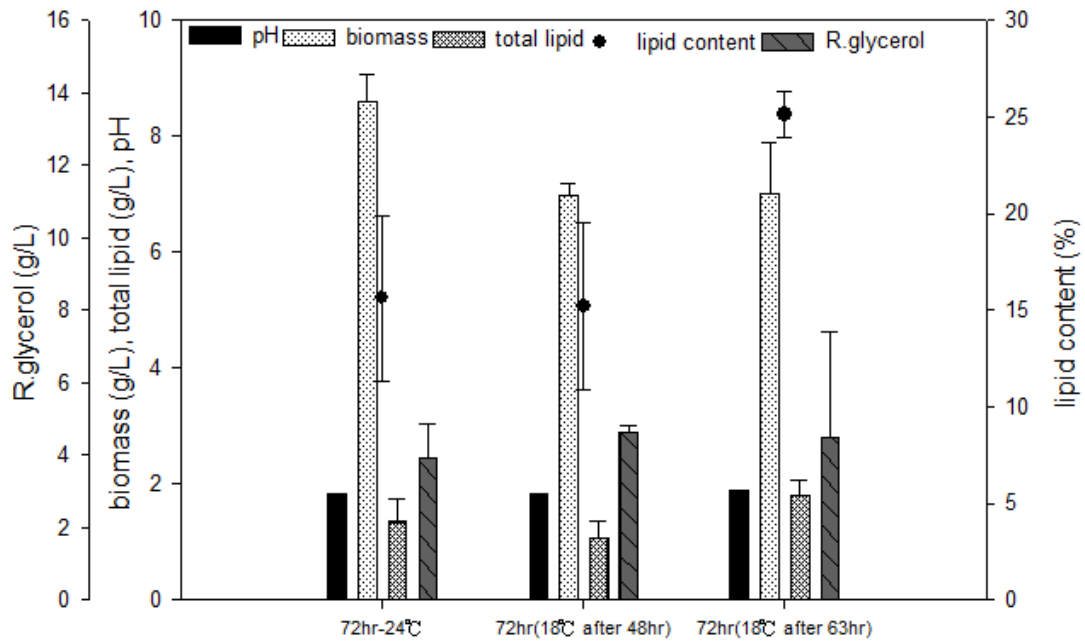


圖 4-6 兩階段溫度培養策略，培養 72 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長影響 (溫度-control (24°C)、18°C after 48hr、18°C after 63hr)

表 4-6 兩階段溫度培養策略，培養 72 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長影響 (溫度-control (24°C)、18°C after 48hr、18°C after 63hr) 之實驗數據

Based-medium	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	R.glycerol (g/L)
18°C after 48hr	1.84 ±0.12	6.97 ±0.21	15.17 ±4.32	1.05 ±0.29	4.60 ±0.22
18°C after 63hr	1.87 ±0.05	7.00 ±0.90	25.12 ±1.22	1.79 ±0.27	4.49 ±2.88
control (24°C)	1.82 ±0.05	8.60 ±0.46	15.61 ±4.31	1.34 ±0.40	3.905 ±0.93

## 4.2 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序

本實驗利用 5 L 氣舉式發酵槽進行探討不同條件對 *R. glutinis* 放大培養。

### 4.2.1 不同海水比例影響

在搖瓶實驗中，初步得知使用全海水的可行性，為了進一步探討海水用於工業發酵製成中，且由於搖瓶因無法控制 pH，培養期間 pH 會持續降低，所以我們需要進行 5 L 氣舉式批次發酵培養，在通氣量 1.5vvm、溫度 24°C、pH 5.5 條件下，探討海水對 *R. glutinis* 的影響性。

本次實驗改變不同比例海水(0%、50%、75%、100%)作為溶劑，實驗結果如圖 4-7、4-8 所示，各比例最大菌體濃度依序為 19.0、18.4、15.6、15.3 g/L，結果發現以海水培養皆會受到高滲透壓環境影響，使 *R. glutinis* 延遲達到穩定期；而在添加 50% 海水培養下，初期生長雖然受到抑制，但在 96hr 後仍可維持穩定成長，若與使用 RO 蒸餾水來進行比較，由表 4-7 可觀察出，無論是最大菌體濃度或是平均脂質含量都是相近的，甚至因受海水中的鈉鹽脅迫下 (Komemushi et al. 1994)，最大脂質含量達到了 43.17%，由此可知在 5 L 發酵槽中使用 50% 海水比例來取代 RO 蒸餾水是可行的。

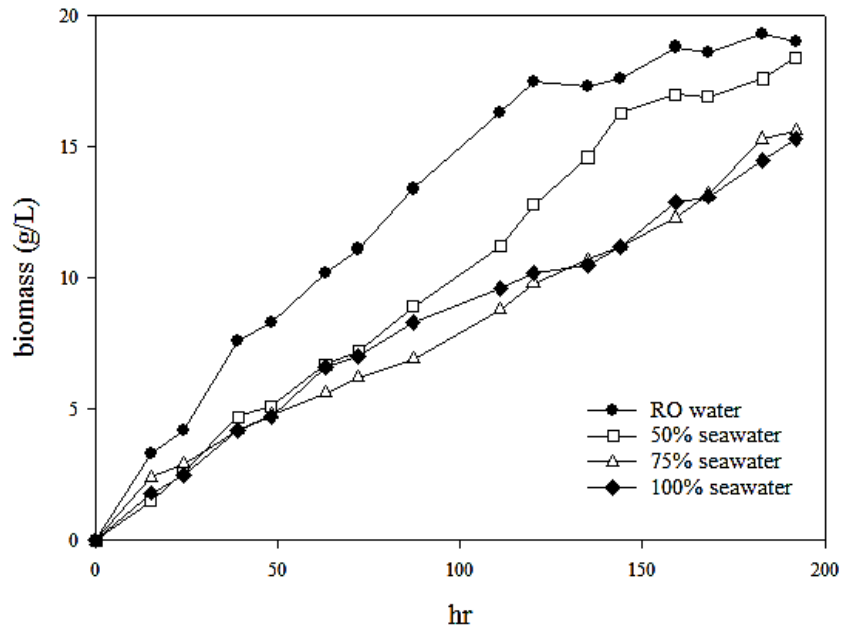


圖 4-7 改變不同比例海水(0%、50%、75%、100%)作為溶劑之菌體濃度比較

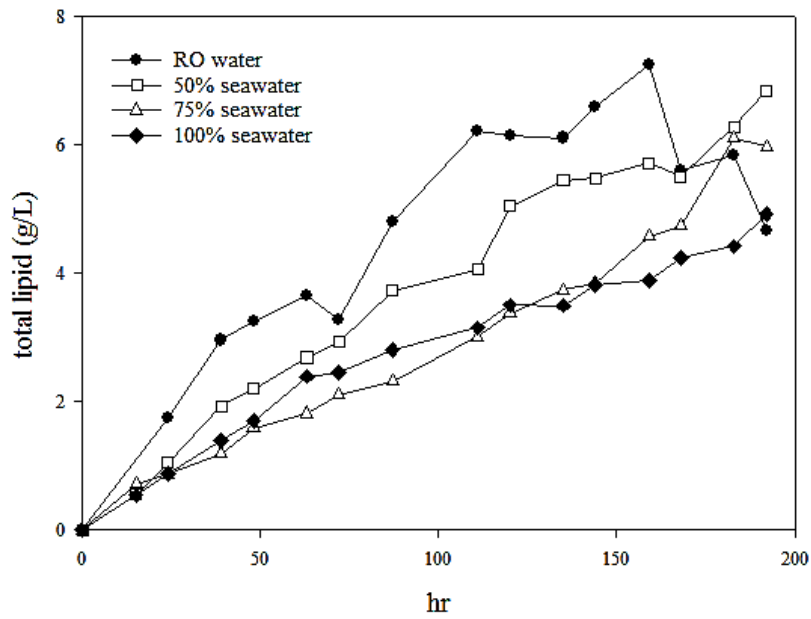


圖 4-8 改變不同比例海水(0%、50%、75%、100%)作為溶劑之脂質累積比較

表 4-7 5L 氣舉式發酵槽，改變不同比例海水(100 %、75 %、50 %、0 %) 作為溶劑，並探討對 *R. glutinis* 生長之實驗數據

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Avg. lipid content (%)	Max. lipid productivity (g/L/h)
RO water	19.0	0.195	38.91	34.83	0.075
50%seawater	18.4	0.121	43.17	38.01	0.049
75%seawater	15.6	0.120	39.87	33.99	0.047
100%seawater	15.3	0.107	36.07	33.32	0.036

#### 4.2.2 80°C滅菌下影響

在前述搖瓶實驗中，發現利用全海水培養下，滅菌溫度只須達到 80°C 即可維持菌體一定量的濃度和脂質累積，降低滅菌溫度的優勢在於，以體積 5.5m<sup>3</sup> 之發酵槽採用 50 ~ 70m<sup>2</sup> 之傳熱面積為例，使用 14°C 之冷水使 121°C 之殺菌培養基冷卻到 30°C，需要 2.5 ~ 4 小時(Müller and Kieslich, 1966)，冷卻過程需消耗大量水資源與能量，如果能使用低溫滅菌，可以大幅縮短冷卻時間與節省蒸氣能源；且工業發酵製成中，發酵槽材質一般為不鏽鋼居多，在富含氯化鈉的海水中經過高溫滅菌容易誘發熱腐蝕(王朝正, 1998)，導致槽壁遭受破壞，所以本實驗將普遍滅菌溫度 121°C 降至 80°C，探討其對 *R. glutinis* 生長的影響性。

實驗結果如表 4-8 所示，*R. glutinis* 的最大菌體濃度可達到 16.3 g/L，最大脂質濃度為 5.97 g/L，並可觀察到最大菌體濃度與控制組(121°C)相比提高了 1.0 g/L，這部分推測 80°C 滅菌下縮短了培養基冷卻時不必要的受熱時間，而提高培養基之營養保存率；脂質含量方面由圖 4-10 顯示出 *R. glutinis* 不受雜菌影響，仍然維持一定的累積量，平均含油率與控制組的 33.32 % 相距不大，結論得知滅菌溫度降低至 80°C 仍然可以有效抑制雜菌生長。

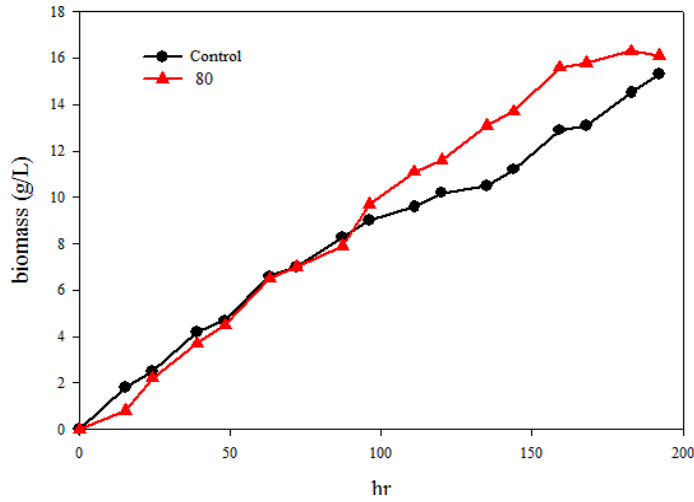


圖 4-9 在 80°C 滅菌下與控制組之菌體濃度比較圖

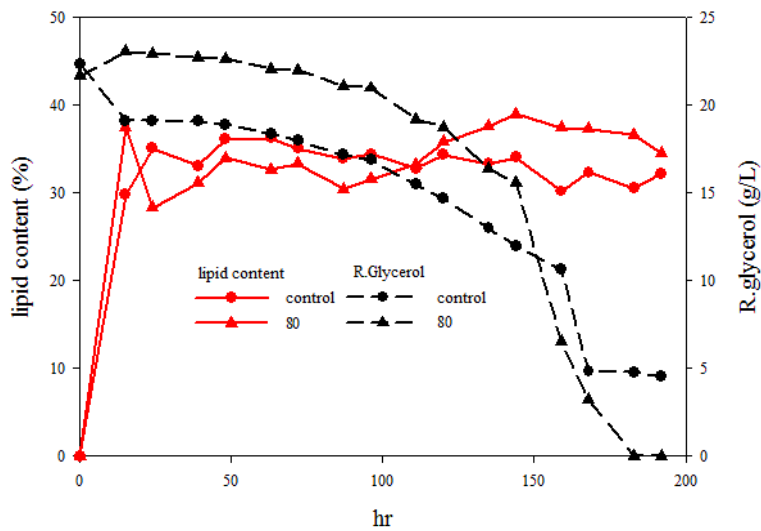


圖 4-10 在 80°C 滅菌下與控制組之脂質累積濃度比較圖

表 4-8 5L 氣舉式發酵槽，以海水作為溶劑在 80°C 滅菌之動力學參數變化

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Avg. lipid content (%)	Max. lipid productivity (g/L/h)
80°C	16.3	0.103	34.41	34.83	0.037
control	15.3	0.107	36.07	33.32	0.036

### 4.2.3 添加 3 % 軟棕櫚油、1 g/L Tween 80 之影響

本實驗選用搖瓶實驗所作之條件(軟棕櫚油、3%)進行測試，實驗結果對比控制組如圖 4-11、4-12，在 192 hr 菌體達到最大濃度 17.2 g/L，比控制組最大濃度提高約 12.42%，可見在有控制 pH 以及溶氧的情況下，菌體生長不再受限於 pH 過低，而總脂質量在 111 hr 即可達到 5.1 g/L，而控制組則需要 192 hr 才能達到此濃度，有文獻指出添加植物油可以增加細胞膜的滲透性，促進從培養基中攝取營養物質，而軟棕櫚油內富含大量脂肪酸供菌體代謝成乙醯輔酶 A，而乙醯輔酶 A 為提供細胞產生脂肪酸合成酵素所需的前驅物(Certik et al., 1997)，而控制組必須要等到菌體生長停滯期才會開始快速累積。

綜合上述，由表 4-9 可得知添加軟棕櫚油能使脂質含量得到大幅提升，故整體脂質量增加，因此添加軟棕櫚油確實有助於提高油脂的產量；在菌量的部分由表 4-9 可得知添加 3 % 軟棕櫚油對於菌體生長方面也有所助益，其產率由 0.107 g/L/hr 提升至 0.128 g/L/hr。

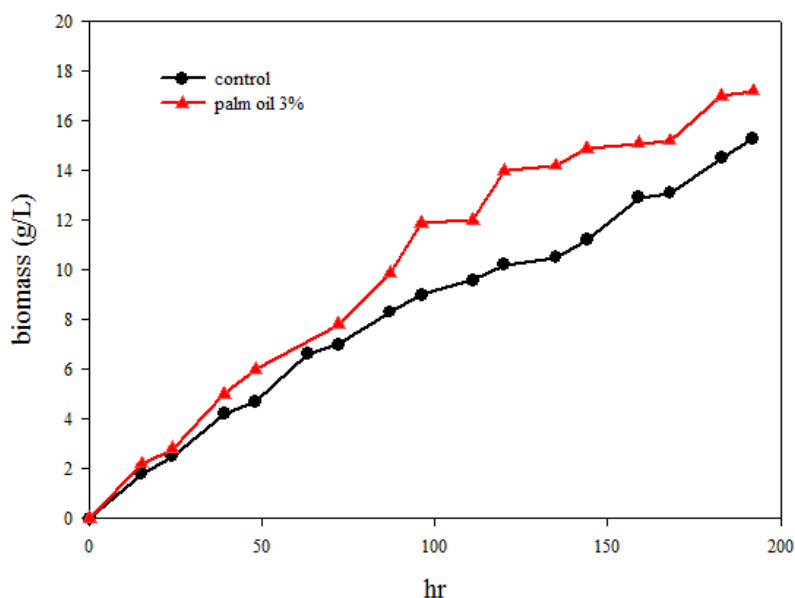


圖 4-11 添加軟棕櫚油 3 % 之菌體濃度比較圖

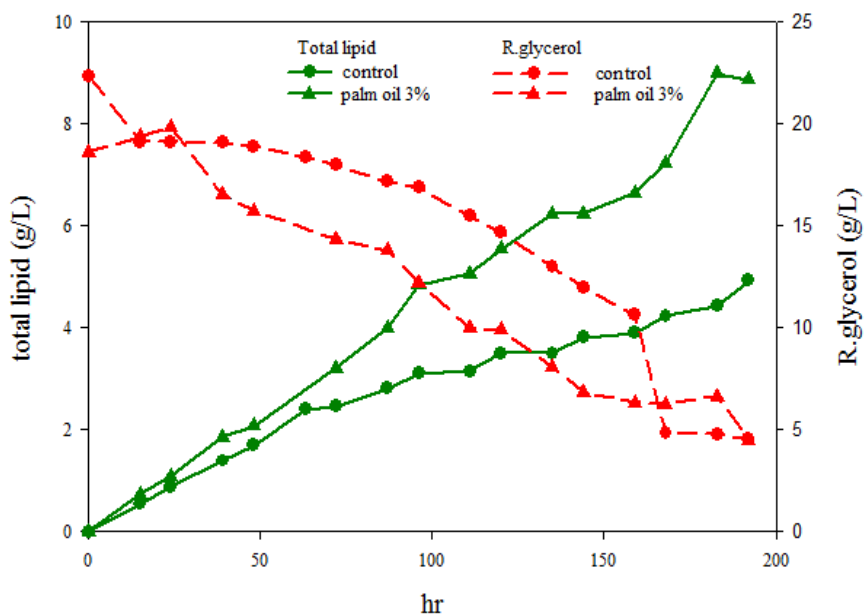


圖 4-12 添加軟棕櫚油 3 % 之脂質累積比較圖

表 4-9 5 L 氣舉式發酵槽添加 3 % 軟棕櫚油之動力學參數變化

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Avg. lipid content (%)	Max. lipid productivity (g/L/h)
Palm oil 3%	17.2	0.128	52.86	42.02	0.050
control	15.3	0.107	36.07	33.32	0.036



#### 4.2.4 添加 3 % 廢棄食用油、1 g/L Tween 80 之影響

現今台灣廢食油大部分倒入下水道或吸油紙吸附後併廢棄物處理，而委託清除處理業者則送至飼料廠作添加劑肥皂原料工業原料及燃料油，總處理容量不超過 4,400 公噸/年，不足以全部吸納廢食用油產生量，又因 B2 生質柴油停用造成廢食油只能外銷不能內用的窘境，使目前台灣缺乏消耗廢食油的管道。

為了近一步探討廢食用油用於工業發酵製成中，本實驗選用搖瓶實驗所作之條件(廢食油、3%)進行測試，利用油脂提供能量及細胞所需之脂肪酸，脂肪酸是構成細胞組織和細胞膜功能的重要物質。實驗結果對比控制組如圖 4-13、4-14，在 192 hr 菌體達到最大濃度 22.3 g/L，比控制組最大濃度提高約 45.75%，推測廢食油裡含有少量的水份、澱粉、蛋白質、食物碎屑等雜質，營養成分高，可見添加廢棄食用油對細胞生長有卓越的幫助；而在脂質累積方面，平均油脂含量為 37.54%，與控制組的 33.32% 相比成長並不明顯，有文獻指出可能廢食油內含有氮源，在低 C/N ratio 影響下會限制脂質累積(Bialy et al, 2011)，本實驗所使用的油品來源多為油炸肉品，推測氮源從肉品滲入煎炸油品中使得廢食油含有高氮。

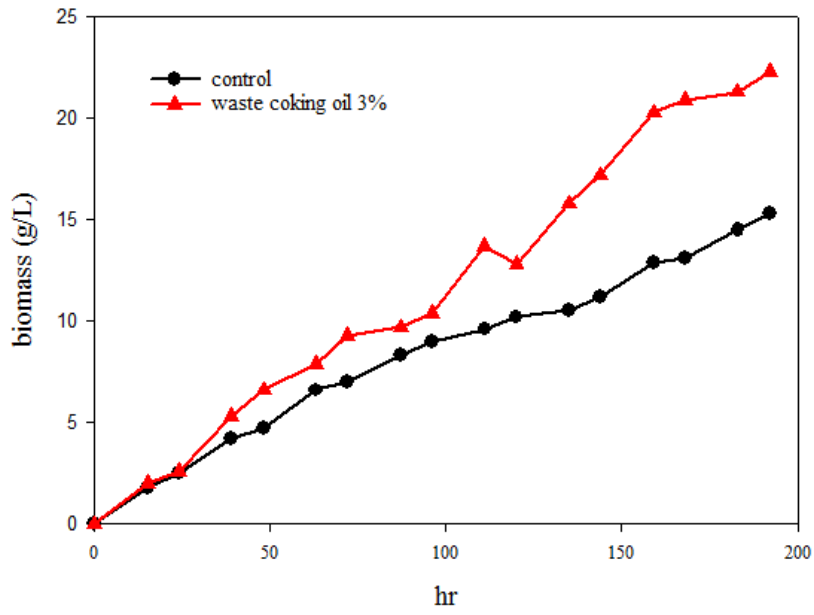


圖 4-13 添加廢棄食用油 3% 之菌體濃度比較圖

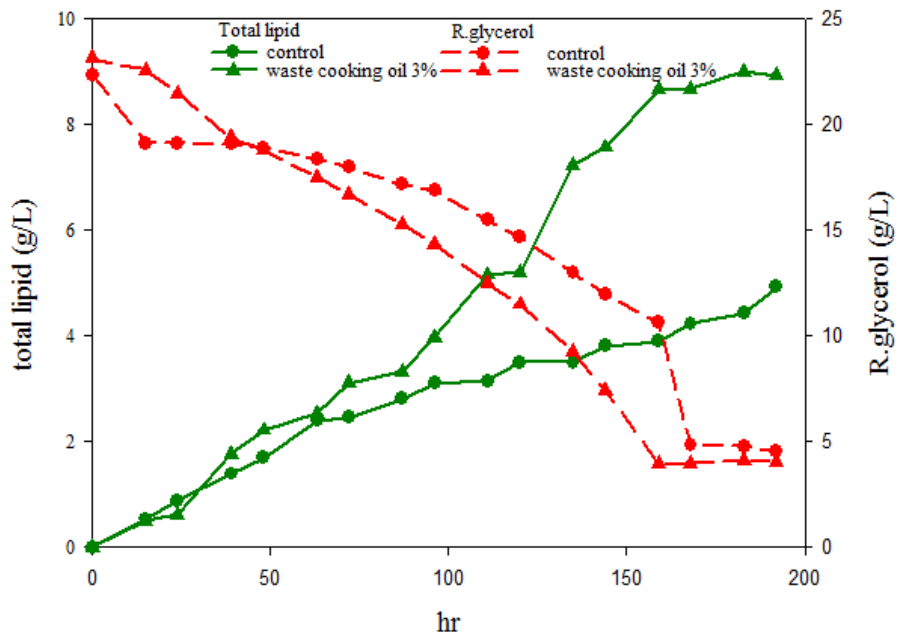


圖 4-14 添加廢棄食用油 3% 之脂質累積比較圖

表 4-10 5 L 氣舉式發酵槽添加 3% 廢棄食用油之動力學參數變化

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Avg. lipid content (%)	Max. lipid productivity (g/L/h)
waste cooking oil 3%	22.3	0.129	42.02	37.54	0.055
control	15.3	0.107	36.07	33.32	0.036

### 4.3 5 L 氣舉式反應器之添加油品綜合探討

添加油品綜合探討，結果如表 4-11 所示，並且分別對於菌體濃度、油脂含量、成本等方面進行探討。

#### I. 添加棕櫚油與廢棄食用油比較

在菌體濃度方面，利用氣舉式發酵槽進行的添加廢棄食用油(3%)相較於添加軟棕櫚油(3%)提升了 29.65%，這部份認為廢棄食用油內所含少量的澱粉、蛋白質、食物碎屑等雜質，而這些含碳有機氮源是構成菌體蛋白和核酸的主要元素，因此在菌體生長方面添加廢食用油的表現比軟棕櫚油優異。

在脂質含量部分，軟棕櫚油平均油脂含量為 42.02%略高於廢棄食用油的 37.54%，從表 4-12 得知軟棕櫚油的脂肪酸組成以棕櫚酸 43.5%及油酸 36.6%為主，而廢食油的組成多以油酸 25%-36%與亞油酸 52%-65%，這部分推測棕櫚酸相比於亞油酸對 *R. glutinis* 油脂累積有較大的刺激效果；另一方面認為廢棄食用油內含有有機氮源，在低 C/N ratio 影響下會限制油脂累積。

在成本方面由表 4-13 所示，以台灣為例，目前廢棄食用油每公升約 10 至 12 元，而軟棕櫚油每公升約 80 至 100 元，為廢食油價格將近 9 倍之多，雖然發酵上 3%的添加量成本並不高，但目前台灣缺乏消耗廢棄食用油的管道，倘若能將廢食用油轉為有經濟效益的脂肪酸，不但可降低成本方面的負擔，亦可避免廢油變成另一種污染源。

## II. 脂肪酸組成變化

由表 4-14 顯示廢棄食用油之添加使得 *R. glutinis* 脂肪酸組成有了變化，與控制組相比其中飽和脂肪酸(硬脂酸、棕櫚酸)的比例下降了 8~9%，而不飽和脂肪酸皆有上升其中油酸比例有了大幅變化由原先 46.1% 上升至 52.5%，亞麻油酸上升約 3~4%，這部分認為因本實驗使用的廢食油種類為大豆油，有文獻指出植物油之添加可促進多元不飽和脂肪酸生成(Certik et al., 1997)，造成不飽和脂肪酸比例提高。

此次回收油含有高不飽和脂肪酸，就氧化安定性而言亦隨著不飽和雙鍵增加而減弱，由表 4-14 顯示廢棄食用油經過 *R. glutinis* 合成新的脂肪酸後，亞麻油酸從原本的 50.91% 下降至 27.26%，含雙鍵的比例減少使氧化安定性提高，讓油品不容易產生酸敗；就十六烷值而言飽和的脂肪酸具有相當高的十六烷值，由結果顯示出在飽和脂肪酸(硬脂酸、棕櫚酸)的比例也上升了約 2-3%，較高的十六烷值能促使柴油燃料有較好的自動著火品質，更可減少排氣中污染物質的含量。

表 4-11 5 L 氣舉式反應器之添加油品綜合比較

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% , w/w)	Avg. lipid content (%)	Max. lipid productivity (g/L/h)
Batch- 5L airlift	15.3	0.107	36.07	33.32	0.036
Batch- 5L airlift (Palm oil 3%)	17.2	0.128	52.86	42.02	0.050
Batch- 5L airlift (waste cooking oil 3%)	22.3	0.129	42.02	37.54	0.055

表 4-12 各油品脂肪酸組成

油脂種類	Saturated Fatty Acid	Unsaturated Fatty Acid
Palm oil (軟棕櫚油)	Palmitic Acid (棕櫚酸) 43.5% Stearic Acid (硬脂酸) 4.3% Myristic Acid (肉豆蔻酸) 1%	Linoleic Acid (亞油酸) 9.1% Oleic Acid (油酸) 36.6%
Waste cooking oil (廢棄食用油)	Palmitic Acid (棕櫚酸) 6-8% Arachidic Acid (花生酸) 0.1%-0.4% Stearic Acid (硬脂酸) 3%-5%	Linolenic Acid (亞油酸) 52%-65% $\alpha$ - Linoleic Acid ( $\alpha$ 亞麻油酸) 2%-3% Oleic Acid (油酸) 25%-36%

表 4-13 各油品價格

植物油種類	Price (NTD) for 1L
Palm oil (軟棕櫚油)	80-100
Waste cooking oil (廢食油)	10-12

表 4-14 各生質柴油之脂肪酸組成

Fermentation Strategy	Relative amount of total fatty acids (% ,w/w)				
	C16 : 0	C18 : 0	C18 : 1	C18 : 2	C18 : 3
control ( <i>R. glutinis</i> )	23.88	4.50	46.13	23.79	1.69
Add waste cooking oil 3% ( <i>R. glutinis</i> )	11.69	8.34	52.50	27.26	0.19
waste cooking oil	13.43	4.88	24.61	50.91	6.17

#### 4.4 5 L 攪拌式發酵槽批次發酵程序

本實驗利用 5 L 攪拌式發酵槽進行 *R. glutinis* 放大培養，探討搖瓶實驗之最適添加濃度，放大至發酵槽的變化。

##### 4.4.1 添加 3 % 廢棄食用油、1 g/L Tween 80 之影響

本實驗選用搖瓶實驗所作之條件(廢棄食用油、3%)放大至 5 L 攪拌式發酵槽進行測試，實驗結果如圖 4-15、4-16，最大菌體濃度為 25.8 g/L，脂質含量在 120 hr 後持平可得約 60%，本實驗結果對比於 5 L 氣舉式發酵槽，可發現使用攪拌式發酵槽對於菌量以及脂質含量更優於氣舉式發酵槽，其中由圖 4-18 可得知甘油消化速率高於氣舉式，而由圖 4-17 中攪拌式之菌體成長速率 0.282 g/L/hr 也高於氣舉式的 0.129 g/L/hr，推測是所使用之碳源粗甘油以及廢食用油皆為油脂，氣舉式發酵槽並不易將其培養基混和均勻，過多油脂浮於反應器頂部造成基質濃度分佈不均，而攪拌式發酵槽藉由葉片高轉速轉動，雖然攪拌翼附近所產生的高剪切力對菌體造成傷害，但具有高質傳能力與混合性質佳等特性，其攪拌效果更優於氣舉式發酵槽，故菌體對於甘油以及所添加之廢食用油有更好的吸收，因而在菌量上表現較佳。

對於脂質部分，由表 4-16 得知攪拌式其脂質累積速率 0.132 g/L/hr 高於氣舉式的 0.055 g/L/hr，推測是氣舉式提供較高的溶氧環境較不利於脂質累積，文獻指出低溶氧的環境較有利於脂質累積(張智勇, 2011)，而攪拌式將溶氧控於 30 % 相對較有利。



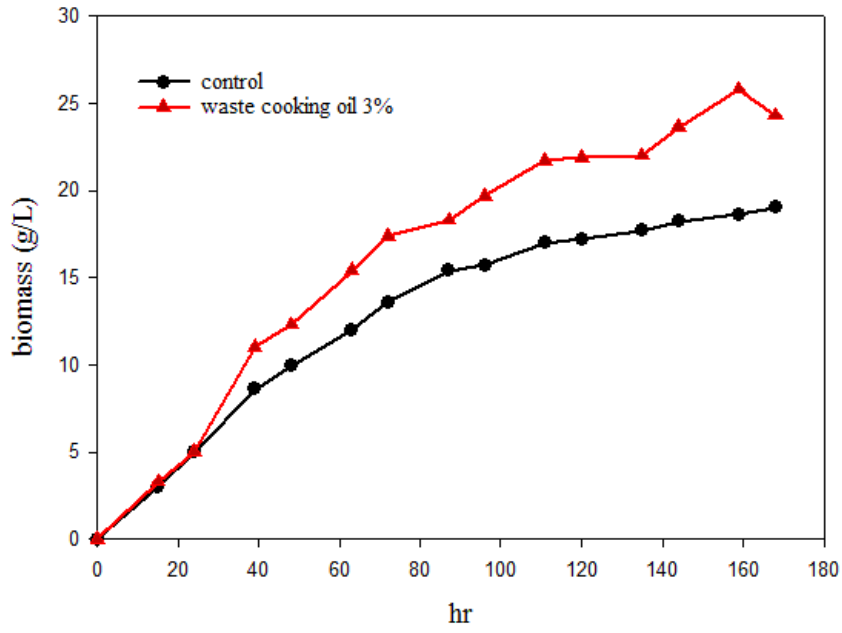


圖 4-15 添加廢棄食用油 3 % 之菌體濃度比較圖

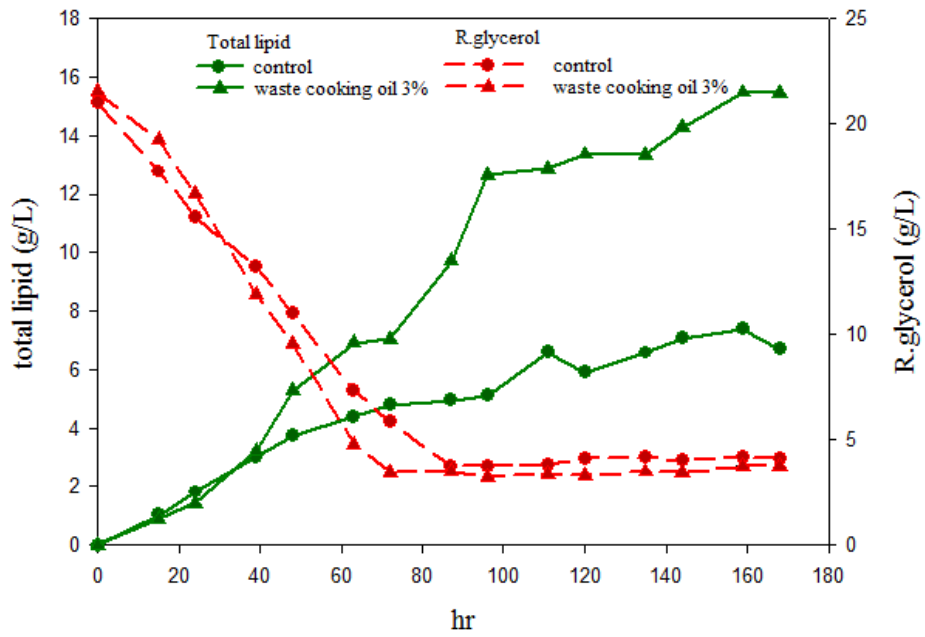


圖 4-16 添加廢棄食用油 3 % 之脂質累積比較圖

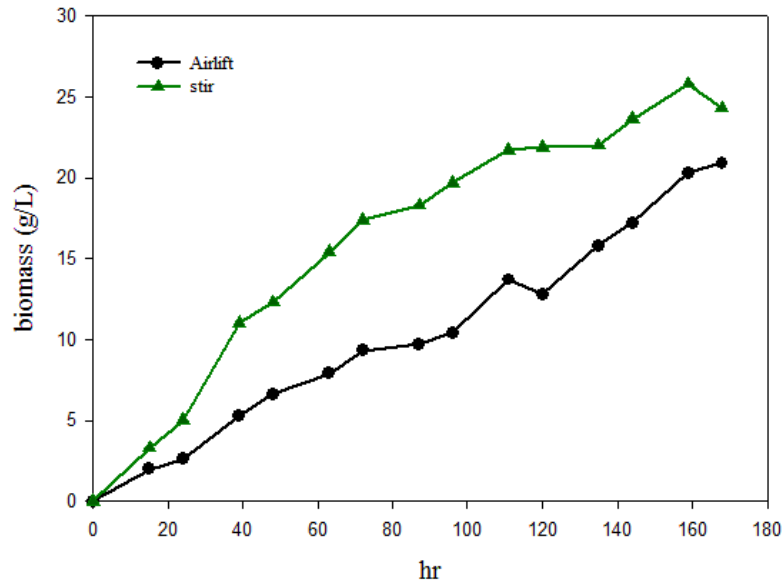


圖 4-17 添加廢棄食用油 3 % -5 L 攪拌式發酵槽 v.s.5 L 氣舉式發酵槽之菌體濃度比較圖

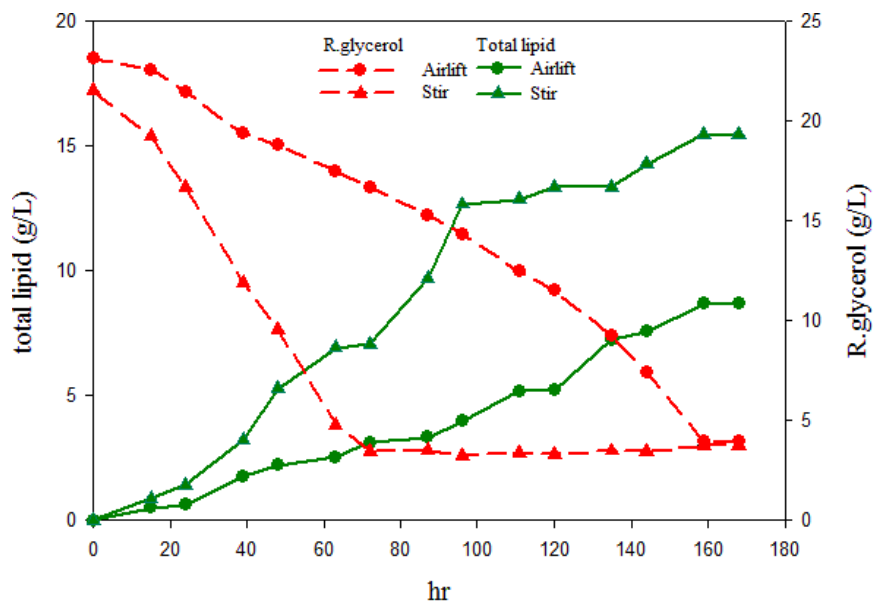


圖 4-18 添加廢棄食用油 3 % -5 L 攪拌式發酵槽 v.s.5 L 氣舉式發酵槽之脂質累積比較圖

表 4-15 5 L 攪拌式發酵槽添加 3% 廢棄食用油之動力學參數變化

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Avg. lipid content (%)	Max. lipid productivity (g/L/h)
waste cooking oil 3%	25.8	0.282	63.58	50.61	0.132
control	19.0	0.22	39.61	35.96	0.077

表 4-16 添加廢棄食用油 3% -5 L 攪拌式發酵槽 v.s.5 L 氣舉式發酵槽之動力學參數變化

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Avg. lipid content (%)	Max. lipid productivity (g/L/h)
stirred tank	25.8	0.282	63.58	50.61	0.132
airlift	22.3	0.129	42.02	37.54	0.055

#### 4.5 50 L 氣舉式發酵槽發酵程序

為了能將 *Rhodotorula glutinis* 的發酵程序用於工業上，本實驗利用 50L 氣舉式發酵槽進行半連續式放大培養，探討使用全海水搭配 3 % 廢食用油對生長中的 *R. glutinis* 影響。

實驗過程中於 96 hr 及 168 hr 排出 20 L 發酵液，並添加新鮮的培養基補充到原有的操作體積繼續培養。實驗結果如圖 4-19 及表 4-17，在 1 vvm 通氣量培養下，最大菌體濃度可達到 32.4 g/L，最大油脂含量為 55.71 %，由於剩餘的培養液可當作種源，可以克服在培養初期受到高滲透壓環境所帶來的抑制效果，並縮短細胞遲滯期時間，持續維持了細胞的指數生長狀態，由此結果表示使用全海水並搭配 3 % 廢食用油 *R. glutinis* 在大型槽體 50L 仍有穩定的表現。

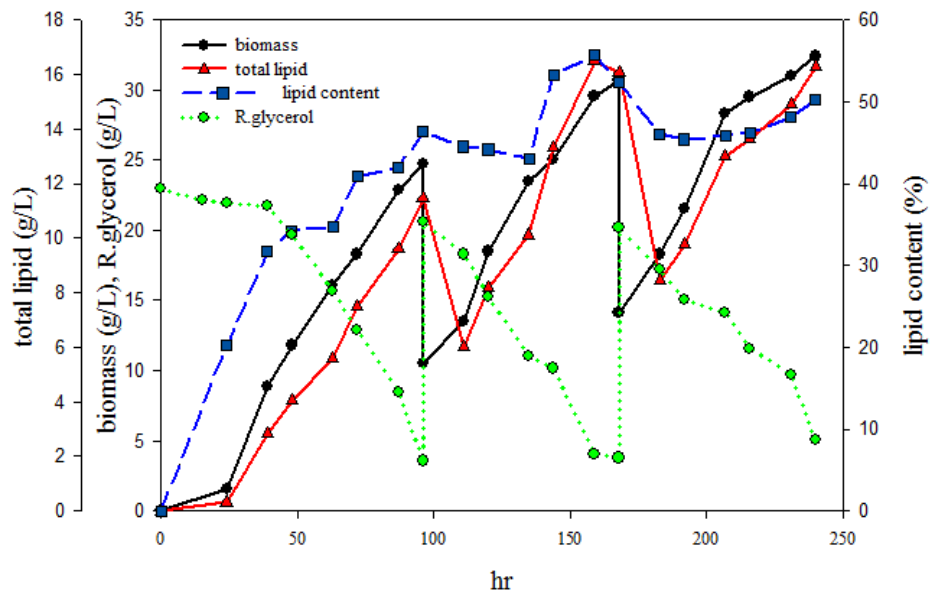


圖 4-19 50L 氣舉式發酵槽-添加廢棄食用油 3 %

表 4-17 50L 氣舉式發酵槽-添加廢棄食用油 3 %

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Max. lipid productivity (g/L/h)
1 vvm & seawater & waste cooking oil 3%	32.4	0.555	55.71	0.355

表 4-18 累積油脂之發酵槽實驗與文獻之比較

Fermentation strategy	Carobon source	Aeration	Max. biomass (g/L)	Avg. lipid content (%)	Max. total lipid (g/L)	Max. lipid productivity (g/L/hr)	Reference
Fed-batch 5 L stirred tank	Glucose	-----	86.2	25.0	11.3	0.14	(Zhang et al., 2014)
Batch 5 L airlift	Glucose and xylose	-----	15.1	36.4 ± 1	5.5	0.09	( Liu et al., 2014 )
Fed-batch 2 L stirred tank	Glycerol	2 vvm	10.1	60.7	6.10	0.09	(Cheirsilp et al., 2011)
Batch 5 L airlift	Crude glycerol	2 vvm	25.4	49.5	16.8	0.21	(劉懿嫻, 2014)
Batch- 50 L airlift (Seawater)	Crude glycerol	1.5 vvm,	22.5	37.1	7.8	0.12	(廖于婷, 2015)
Batch 5 L stirred tank (seawater&WCO3%)	Crude glycerol	1 vvm	25.8	50.61	15.5	0.132	This study
Fed-batch 50 L airlift (Seawater&WCO3%)	Crude glycerol	1.5 vvm	32.4	43.41	16.5	0.355	This study

## 第五章 結論與未來展望

### 5.1 結論

本實驗利用海水與粗甘油進行 *Rhodotorula glutinis* 培養，分成兩大部分進行研究：(1)改變培養基探討；(2)改變環境因子。以下整理出幾點結論：

1. 以海水來取代純水，結果發現 *R. glutinis* 可生長於海水鹽度 35‰ 的環境中，具有一定的耐受度，但培養初期受高滲透壓環境影響，使生長受到抑制。
2. 5L 氣舉式發酵槽中改變不同比例海水(50%、75%、100%)作為溶劑條件下，結果發現 50% 的海水添加量可達到與純水相近的菌體生長量與油脂累積量，這結果雖然不符合預期全海水的使用，但對於降低成本與節省水資源仍有一定的幫助。
3. 5L 氣舉式發酵槽中利用海水將滅菌溫度降至 80°C，仍然不受雜菌污染並可以穩定維持菌體濃度和脂質累積，所以全海水使用並搭配低溫滅菌策略對於 *R. glutinis* 是可行的。
4. 移除培養基中的微量元素，讓 *R. glutinis* 直接從海水中攝取無機鹽類來培養，初步在搖瓶實驗中是可行的。

5. 利用兩階段溫度培養策略，在細胞生長期時維持較高培養溫度，使菌體數量達對數其最高峰，再於脂肪酸合成期提供較低溫的環境，來快速提高脂肪酸含量，此方法明顯可提升油脂含量約 1.61 倍。
6. 軟棕櫚油與廢食油之添加對比於控制組，菌體濃度以及脂質含量皆得到顯著提升，但考量到添加油品成本與目前台灣缺乏消耗廢棄食用油的管道，最後選擇以廢棄食用油進行添加。
7. 由於回收廢食用油含有高不飽和脂肪酸，利用 *R. glutinis* 改變原來廢棄食用油脂肪酸組成，亞麻油酸從原本的 52-65 % 下降至 27.26 %，氧化安定性提升使油品不容易產生酸敗；在飽和脂肪酸(硬脂酸、棕櫚酸)的比例也上升了約 5 %，由於飽和的脂肪酸具有相當高的十六烷值，提昇十六烷值能促使柴油燃料有較好的自動著火品質，更可減少排氣中污染物質的含量。
8. 在添加廢食用油方面，攪拌式發酵槽無論是菌體濃度或是脂質含量皆優於氣舉式發酵槽，氣舉式發酵槽並不易將含有油脂的培養基混和均勻，過多廢食油與粗甘油浮於反應器頂部造成基質濃度分佈不均，而攪拌式發酵槽藉由葉片高轉速轉動，具有高質傳能力與混合性質佳等特性。



## 5.2 未來展望

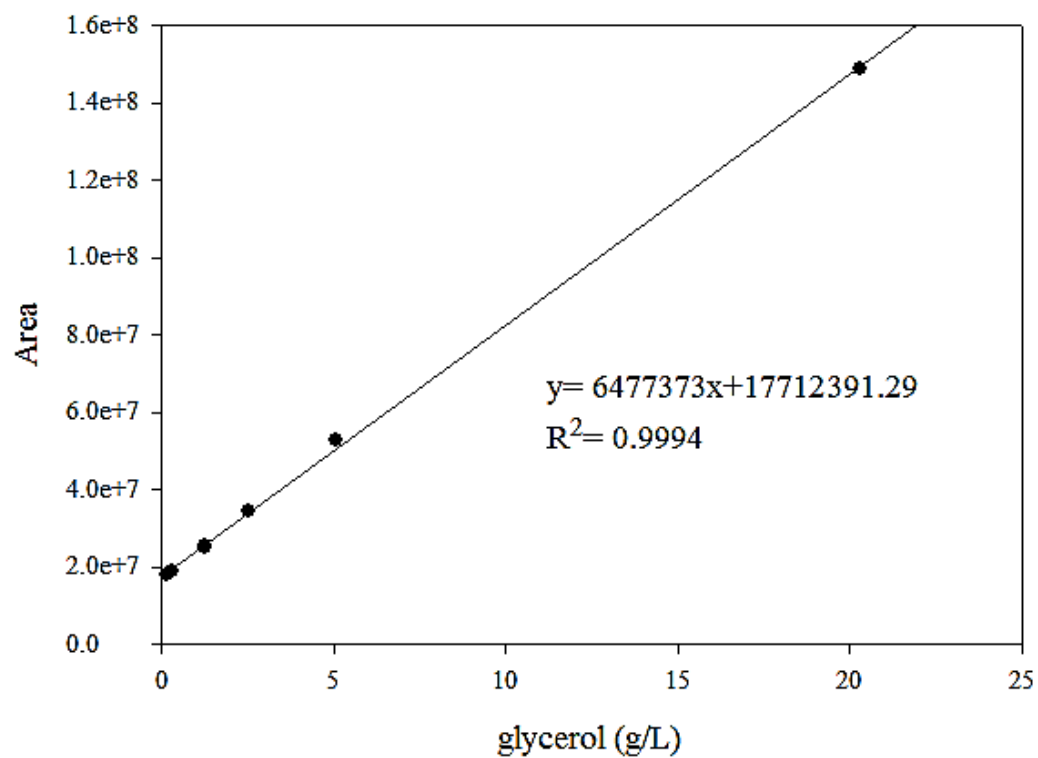
對於後續之研究，有以下幾點值得去探討：

首先，各地取得的海水會因地理位置或深度不同而得到的礦物質成分比例大有不同，本實驗中的海水取樣於深度較淺的沿岸，倘若能使用海洋深層水進行，由於營養鹽經常湧至海洋表層，亦含有豐富之微量元素與各種礦物質成分與不易遭受人為污染等特性，未來相信更利於菌體生長。

而在 *Rhodotorula glutinis* 此株酵母菌在發酵過程方面，初步得知使用海水並搭配低溫滅菌策略的可行性，未來若能繼續研究在海水培養後萃取與轉脂化成生質柴油的分離純化問題，以及使轉脂後的生質柴油穩定品質性探討油，必定能使其可行性更向前邁進。

## 附錄

### 附錄 A



Glycerol 標準檢量線方程式：

$$\text{Glycerol conc.} = (\text{Peak area} - 17712391.29) / 6477373$$

## 參考文獻

- 王朝正、王裕賢、張永忠(1998)。“氯化鈉熱腐蝕之回顧”。防鏽工程，12，47-63。
- 余依嬛 (2012)。以工業廢棄物粗甘油與酒糟水做為培養基探討 *Rhodotorula glutinis* 的生長影響。東海大學 化學工程與材料工程所碩士論文。
- 廖于婷 (2015)。海水與滅菌策略對黏紅酵母菌於氣舉式發酵槽中生長之影響性。東海大學 化學工程與材料工程研究所碩士論文。
- 劉懿嫻 (2014)。以粗甘油作為碳源探討利用氣舉式發酵槽培養 *Rhodotorula glutinis* 生產  $\beta$ -胡蘿蔔素及微生物油脂之可行性。東海大學 化學工程與材料工程研究所碩士論文。
- 蘇國智 (2016)。探討固態及液態深層發酵對 *Rhodotorula glutinis* 生產  $\beta$ -胡蘿蔔素之影響。東海大學 化學工程與材料工程研究所碩士論文。
- Alaswad, A., Dassisti, M., Prescott, T., & Olabi, A. G. (2015). Technologies and developments of third generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 1446-1460.
- Bhosale, P., & Gadre, R. V. (2001). Production of  $\beta$ -carotene by a *Rhodotorula glutinis* mutant in sea water medium. *Bioresource technology*, 76(1), 53-55.
- Certik, M., & Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of bioscience and bioengineering*, 87(1), 1-14.
- Čertík, M., Baltuszov, L., & Šajbidor, J. (1997). Lipid formation and  $\gamma$ -linolenic acid production by Mucorales fungi grown on sunflower oil. *Letters in Applied Microbiology*, 25(2), 101-105.

- Chi, Z., Zheng, Y., Jiang, A., & Chen, S. (2011). Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *165*(2), 442-453.
- Cukalovic, A., Monbaliu, J. C. M., Eeckhout, Y., Echim, C., Verhé, R., Heynderickx, G., & Stevens, C. V. (2013). Development, optimization and scale-up of biodiesel production from crude palm oil and effective use in developing countries. *Biomass and bioenergy*, *56*, 62-69.
- Easterling, E. R., French, W. T., Hernandez, R., & Licha, M. (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*, *100*(1), 356-361.
- El Bialy, H., Gomaa, O. M., & Azab, K. S. (2011). Conversion of oil waste to valuable fatty acids using oleaginous yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(12), 2791-2798.
- Gao, Z., Ma, Y., Wang, Q., Zhang, M., Wang, J., & Liu, Y. (2016). Effect of crude glycerol impurities on lipid preparation by *Rhodospiridium toruloides* yeast 32489. *Bioresource technology*, *218*, 373-379.
- Hajjari, M., Tabatabaei, M., Aghbashlo, M., & Ghanavati, H. (2017). A review on the prospects of sustainable biodiesel production: A global scenario with an emphasis on waste-oil biodiesel utilization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *72*, 445-464.
- Hejna, A., Kosmela, P., Formela, K., Piszczyk, Ł., & Haponiuk, J. T. (2016). Potential applications of crude glycerol in polymer technology—Current state and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *66*, 449-475.
- Hiremath, A., Kannabiran, M., & Rangaswamy, V. (2011). 1, 3-Propanediol production from crude glycerol from jatropha biodiesel process. *New biotechnology*, *28*(1), 19-23.
- Hussain, M. N., Al Samad, T., & Janajreh, I. (2016). Economic feasibility of biodiesel production from waste cooking oil in the UAE. *Sustainable Cities and Society*, *26*, 217-226.

- Johnson, V., Singh, M., Saini, V. S., Sista, V. R., & Yadav, N. K. (1992). Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(4), 382-384.
- Komemushi, S., Sakaki, H., Yokoyama, H., Fujita, T. (1994) Effect of barium and other metals on the growth of a D-lactic acid assimilating yeast *Rhodotorula glutinis* N21. *J Antibact Antifung Agt* 22: 583–587.
- Lammers, P. J., Kerr, B. J., Honeyman, M. S., Stalder, K., Dozier III, W. A., Weber, T. E., ... & Bregendahl, K. (2008). Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens. *Poultry Science*, 87(1), 104-107.
- Leman, J. (2009). Lipids, Production A2- Schaechter, Moselio BT - Encyclopedia of Microbiology. In Oxford: Academic Press, 393–406.
- Liang, M. H., & Jiang, J. G. (2013). Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in lipid research*, 52(4), 395-408.
- Lorenz, E., Runge, D., Marbà-Ardébol, A. M., Schmach, M., Stahl, U., & Senz, M. (2017). Systematic development of a two-stage fed-batch process for lipid accumulation in *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Biotechnology*, 246, 4-15.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable energy*, 34(1), 1-5.
- Morris, A. W., & Riley, J. P. (1966, August). The bromide/chlorinity and sulphate/chlorinity ratio in sea water. In *Deep sea research and oceanographic Abstracts* (Vol. 13, No. 4, pp. 699-705). Elsevier.
- Müller, R., & Kieslich, K. (1966). Technology of the Microbiological Preparation of Organic Substances. *Angewandte Chemie International Edition*, 5(7), 653-662.
- Onishi, H., & Suzuki, T. (1970). Microbial production of D-mannitol and D-fructose from glycerol. *Biotechnology and bioengineering*, 12(6), 913-920.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86(11), 807-815.
- Richard D. O'Brien. (2009). *Fats and oils formulating and processing for applicaitoons*, 3th editon, 43-47, 50-52. New York: CRC Press.

- Rymowicz, W., Rywińska, A., & Gładkowski, W. (2008). Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. *Chemical Papers*, 62(3), 239-246.
- Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., & Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, 46(1), 210-218.
- Schneider, T., Graeff-Hönninger, S., French, W. T., Hernandez, R., Merkt, N., Claupein, W., ... & Pham, P. (2013). Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy*, 61, 34-43.
- Taskin, M., Ortucu, S., Aydogan, M. N., & Arslan, N. P. (2016). Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29. *Renewable Energy*, 99, 198-204.
- Tamura, S., Park, Y. S., Okabe, M., Seriu, Y., & Takeda, S. (1996). Efficient tylosin production from *Streptomyces fradiae* using rapeseed oil. *Journal of fermentation and bioengineering*, 82(2), 183-186.
- Thompson, J. C., & He, B. B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied engineering in agriculture*, 22(2), 261-265.
- Wu, S., Hu, C., Jin, G., Zhao, X., & Zhao, Z. K. (2010). Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource technology*, 101(15), 6124-6129.
- Yen, H. W., Yang, Y. C., & Yu, Y. H. (2012). Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 114(4), 453-456.
- Zhang, Z., Zhang, X., & Tan, T. (2014). Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. *Bioresource technology*, 157, 149-153.