

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.

黏紅酵母菌油脂萃取與酸催化轉酯製程之研究探討

The study of *Rhodotorula glutinis* oil extraction and acids
transesterification process

研究生：鄭晉安 撰

Graduate student : Jin-An Zheng

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

誌 謝

從大學專題生到碩士研究生，一路上受到許多人的幫助和照顧，首先要感謝指導教授 顏宏偉老師，在長達三年的時間中，給了許多教誨和建議，使我在求學路上受益良多，老師也叮嚀我們需要隨時保持旺盛的求知慾，與對更美好未來的渴望，也轉換成了我人生前進的動力，推著我前往人生下一個階段繼續邁進，在此謹致上由衷的謝意。同時感謝中國醫醫研部 張瑞仁教授、南臺生物科技系 陳柏庭教授，於口試期間給予寶貴的建議，在此致上最誠摯的謝意。

在大學專題至研究所的求學過程中，感謝學長姐于婷、品奴、車車、國智、裕仁、老漢、子翔的指導，也謝謝同學爾街、惟翔、智淵、威仁、猩猩、蕭蕭、榮駿、俊嘉的互相鼓勵與照顧，以及感謝學弟妹大熊、悠軫、子容、又誠、峻緯、鏡璇、趙庭、界豪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系辦學姐們、以及系上老師們，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。

中文摘要

Rhodotorula glutinis (BCRC 22360) 屬於紅酵母菌之一，其生長快速、可進行高密度細胞培養，並能以廢棄物粗甘油作為碳源，兼具環保價值。其所累積的油脂中不飽和脂肪酸所佔的含量高達 72% 以上，且類似於植物油，因此適合作為製造生質柴油的油脂，具有相當高發展潛力。本研究利用此菌株進行發酵培養後，探討不同油脂萃取方式與產製生質柴油之酸催化轉酯製程。

萃取黏紅酵母油脂不須經破細胞壁，直接添加甲醇萃取液經攪拌萃取 1hr 便能萃出大量脂質。菌重與添加水之體積比 (w/v) 以 1:20，其結果與毫無添加水之萃取油脂結果相近。不管使用超音波輔助或是直接萃取，初步結果顯示在含水量低的情況下似乎對於油脂萃取不會造成太顯著的影響，因此使用未完全乾燥之菌體來進行油脂萃取應該是可行的，能省去繁雜的前處理，與降低能源的損耗。而不經破碎細胞壁萃取油脂之方式是可行的，相信對於使用濕菌進行直接萃取油脂是一大幫助，不僅可省去繁雜的洗菌、凍乾菌體之前處理，也大大節省了能源的損耗。

直接轉酯化係將脂質萃取及轉酯化同步進行，可取代傳統 SCO 生產生質柴油方式，由於省略了破菌及脂質萃取之步驟，除了節省能源及減少有機溶劑使用外，亦能有效降低生產成本。酸催化轉酯製成以濃硫酸當作催化劑，探討不同變因，如時間、溫度、甲醇添加量、催化劑濃度，得到菌重比甲醇(w/v)以 1:40，添加催化劑濃度 0.235M，於 70°C 下反應 1 小時，直接轉酯化所得到的生質柴油含量為 70.58%，產率 77.64%；微波轉酯製成則是以菌重比甲醇(w/v)以 1:40，添加催化劑濃度 0.235M，於 100W 下反應 5 分鐘，所得到生質柴油含量為 68.27%，產率 46.25%。雖然使用微波轉酯可以快速得到生質柴油，但由於產率偏低，加上如果要放大製成，恐怕微波反應裝置無法製造出符合的規模，因此簡化微生物

油脂生產生質柴油之步驟，使其能有效降低成本，更接近商業化之目標，還是以直接轉酯化較為可行。而菌體在含水量低的情況下直接轉酯化其 FAME Content 還有產率與乾燥菌體直接轉酯化並無太大的變化，因此初步認為使用未完全乾燥之菌體進行轉酯化是可行的，將能省去繁雜的前處理，節省了能源的損耗，有效降低成本。

關鍵字：*R. glutinis*、微生物油脂、萃取、轉酯化、生質柴油

Abstract

Rhodotorula glutinis (BCRC 22360) is an oleaginous that grew fast with high lipid content biomass and can accumulate copious amounts of lipid. It also can use waste crude glycerol as carbon source and with environmental value. It accumulates of unsaturated fatty acids in the oil content up to 72% or more. The oil composition is similar to vegetable oil, therefore it is a potential alternative oil resource for biodiesel production. In this study, use *R. glutinis* to fermentation culture then for oil extraction and acids transesterification process.

The result of the extraction of lipids can be found by directly extraction of lipids. The consequent is similar to use mechanical properties (ultrasonic) to extract. Further, use 1:20 (w/v) dried biomass to water ratio to compare non add water shows that the result is similar. The preliminary results show that there is no significant effect on oil extraction when water content of the biomass is low. Therefore it's feasible don't through a broken cell wall will be able to extraction of oils. And believe that using wet biomass to direct extraction oil is a big help. Not only eliminates complex of centrifugal and freeze-dry before pretreatment, but also saves energy loss.

It is more feasible to simplify SCO production of biodiesel by direct transesterification. Direct transesterification with sulfuric acid as a catalyst to research different causes such as time, temperature, methanol addition, concentration of catalyst. The condition was found to be 1:40 (w/v) dried biomass to methanol ratio and catalyst (H_2SO_4) concentration was 0.235M for 1hr at 70°C. Under these conditions, the fatty acid methyl ester (FAME) content was 70.58% and the yield was

77.64%. Microwave transesterification the condition was found to be 1:40 (w/v) dried biomass to methanol ratio and catalyst (H_2SO_4) concentration was 0.235M for 5min at 100W. Under these conditions, the fatty acid methyl ester (FAME) content was 68.27% and the yield was 46.25%. The result of direct transesterification by using dry biomass and using dry biomass which add equal amount of water is similar, therefore, we assume that using incompletely dry biomass for transesterification is feasible.

Keywords: *Rhodotorula glutinis* · single cell oil · extract · transesterification · biodiesel

目錄

中文摘要	I
Abstract.....	III
第一章 緒論	1
第二章 文獻回顧	2
2.1 生質柴油	2
2.1.1 生質柴油與石化柴油之比較.....	5
2.1.2 生質柴油副產物-粗甘油	7
2.1.3 產製生質柴油之方法	9
2.2 直接轉酯化反應	11
2.2.1 直接鹼催化轉酯化反應	11
2.2.2 直接酸催化轉酯化反應	12
2.2.3 濕菌轉酯化.....	13
2.3 微波原理及轉酯化.....	14
2.3.1 微波原理	14
2.3.2 微波轉酯化.....	14
2.4 產油微生物	15
2.4.1 微生物油脂.....	17

2.5	微生物產油機制	18
2.6	不同萃取微生物油脂方法	22
2.7	紅酵母菌 (<i>Rhodotorula</i>)	23
2.7.1	菌種選擇- <i>Rhodotorula glutinis</i>	24
2.8	發酵策略	24
2.8.1	批次微生物油脂發酵	24
第三章	材料與方法	25
3.1	實驗材料	25
3.1.1	菌株	25
3.1.2	實驗藥品	26
3.2	實驗儀器	28
3.3	分析方法	30
3.3.1	菌體濃度分析方法	30
3.3.2	葡萄糖濃度分析方法	30
3.3.3	甘油分析方法	30
3.3.4	總脂質濃度分析方法	31
3.3.5	超高壓細胞破壁萃取率(破壁率)	31
3.3.6	薄膜層析法 (TLC)	31

3.3.7	生質柴油組成及產率	32
3.4	實驗方法	33
3.4.1	原始菌種保存	33
3.4.2	培養基組成	33
3.4.3	搖瓶發酵培養基 (Fermentation medium, FM)	34
3.4.4	接菌	34
3.5	實驗架構	35
3.6	實驗方法	36
3.6.1	5L 氣舉式批次發酵程序 (Fermentation Experiments)	36
3.6.2	100 L 氣舉式批次發酵程序 (Fermentation Experiments)	36
3.7	探討不同油脂萃取方式	37
3.7.1	超高壓破壁萃取油脂 (委託金屬工業研發中心協助進行實驗)	37
3.7.2	超音波破碎萃取油脂	37
3.7.2.1	利用不同有機溶劑進行油脂萃取	37
3.7.2.2	添加不同甲醇量對於萃取油脂之影響	39
3.7.2.3	添加不同水量對於萃取油脂之影響	39
3.7.3	不破細胞壁直接進行油脂萃取	40
3.7.3.1	添加不同甲醇量對於萃取油脂之影響	40

3.7.3.2	添加不同水量對於萃取油脂之影響	41
3.7.3.3	不同萃取時間之影響	42
3.8	利用乾燥黏紅酵母菌直接轉酯化.....	43
3.8.1	鹼催化轉酯反應	43
3.8.2	直接酸催化轉酯反應	44
3.8.2.1	探討催化劑添加體積、溫度、時間、甲醇量、含水量等參數對 生質柴油產率的影響.....	45
3.8.2.2	直接酸催化轉酯之最佳條件.....	48
3.8.3	微波酸催化轉酯反應	48
3.8.3.1	探討催化劑添加體積、功率、時間、甲醇量、含水量等參數對 生質柴油產率的影響.....	50
3.8.3.2	微波轉酯化之最佳條件	53
3.9	實驗裝置圖	54
3.9.1	搖瓶發酵培養裝置圖	54
3.9.2	5 L 氣舉式批次發酵培養裝置圖	55
3.9.3	100 L 氣舉式饋料發酵培養裝置圖.....	56
3.9.4	直接轉酯化裝置圖	57
3.9.5	微波轉酯化裝置圖	58
第四章	結果與討論	59

4.1	氣舉式批次發酵程序.....	59
4.1.1	5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序	59
4.1.2	100L 氣舉式發酵槽饋料批次發酵程序.....	61
4.2	不同油脂萃取方式.....	63
4.2.1	超高壓破壁萃取油脂	64
4.2.1.1	添加液對於萃取率之影響.....	66
4.2.1.2	壓力對於萃取率之影響	66
4.2.1.3	升降壓次數對於萃取率之影響.....	66
4.2.1.4	添加離子水作為添加液對於萃取率之影響	67
4.2.1.5	不經超高壓破壁對照組	67
4.2.2	超音波破碎萃取油脂	67
4.2.2.1	不同有機溶劑之萃取效果.....	67
4.2.2.2	添加不同甲醇量對於萃取率之影響	69
4.2.2.3	不同含水量對於萃取率之影響.....	71
4.2.3	不破細胞直接萃取油脂	73
4.2.3.1	添加不同甲醇量對於萃取率之影響	73
4.2.3.2	不同含水量對於萃取率之影響.....	75
4.2.3.3	不同萃取時間對於萃取率之影響	76

4.3	不同油脂萃取方式之綜合討論.....	78
4.4	鹼催化轉酯反應.....	80
4.5	直接酸催化轉酯化.....	82
4.5.1	不同反應時間對於生質柴油產率的影響.....	84
4.5.2	不同反應溫度對於生質柴油產率的影響.....	85
4.5.3	不同甲醇比例對於生質柴油產率的影響.....	87
4.5.4	不同催化劑含量對於生質柴油產率的影響.....	89
4.5.5	直接酸催化轉酯之最適條件.....	91
4.5.6	濕菌直接轉酯化對於生質柴油產率的影響.....	94
4.6	微波酸催化轉酯化.....	96
4.6.1	不同微波功率對於生質柴油產率之影響.....	98
4.6.2	不同微波時間對於生質柴油產率之影響.....	100
4.6.3	不同甲醇比例生質柴油產率之影響.....	102
4.6.4	不同催化劑含量對於生質柴油產率的影響.....	104
4.6.5	微波酸催化轉酯化之最適條件.....	106
4.6.6	濕菌微波轉酯化對於生質柴油產率之影響.....	107
4.7	酸催化轉酯綜合探討.....	109
第五章	結論與未來展望.....	113

5.1 結論.....	113
5.2 未來展望.....	114
參考文獻	115
附錄.....	119
作者簡歷	123

圖目錄

圖 2-1	全球生質燃料市場產值預測.....	3
圖 2-2	生質柴油.....	3
圖 2-3	在柴油中添加 2 %生質柴油的 B2	4
圖 2-4	酯化反應式(Freedman et al.,1986).....	10
圖 2-5	轉酯化反應式(Fukuda et al.,2001).....	10
圖 2-6	檸檬酸循環代謝圖 (Ratledge., 2004)	19
圖 2-7	脂肪酸累積代謝圖 (Ratledge., 2004)	20
圖 2-8	The fatty acid and TAG biosynthesis pathway in microorganisms. (Liang et al., 2013)	21
圖 3-1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	25
圖 3-2	以微生物油脂生產生質柴油之傳統程序(Hidalgo et al.,2013).....	43
圖 3-3	以微生物油脂生產生質柴油之直接轉脂化程序	43
圖 3-4	<i>Rhodotorula glutinis</i> 之搖瓶實驗裝置圖	54
圖 3-5	5 L 氣舉式發酵槽裝置圖	55
圖 3-6	100 L 氣舉式發酵槽裝置圖	56
圖 3-7	隔水加熱進行直接酸催化轉酯	57
圖 3-8	微波轉酯化裝置圖	58

圖 4-1	添加 2.5 % 廢棄食用油與 1 g/L Tween80 培養之 5L 氣舉式發酵槽.....	60
圖 4-2	以葡萄糖為碳源進行培養之 100L 氣舉式發酵槽.....	62
圖 4-3	不同萃取溶劑系統及油脂萃取率比較.....	64
圖 4-4	萃取油脂後固化.....	66
圖 4-5	不同有機溶劑萃取油脂之回收率.....	68
圖 4-6	經超音波破壁添加不同甲醇量萃取油脂之回收率.....	69
圖 4-7	經超音波破壁添加不同水量萃取油脂之回收率.....	71
圖 4-8	不經破壁添加不同甲醇量直接萃取油脂之回收率.....	74
圖 4-9	不經破壁添加不同水量直接萃取油脂之回收率.....	75
圖 4-10	不破壁直接萃取之不同萃取時間油脂回收率.....	77
圖 4-11	鹼催化轉酯皂化現象.....	80
圖 4-12	100L 氣舉式發酵槽菌體之脂質含量.....	82
圖 4-13	比較兩步驟轉酯化與直接轉酯化之生質柴油產率.....	83
圖 4-14	不同反應時間之生質柴油產率.....	84
圖 4-15	不同溫度之生質柴油產率.....	86
圖 4-16	不同甲醇比例之生質柴油產率.....	87
圖 4-17	不同催化劑含量之生質柴油產率.....	90
圖 4-18	最適條件比較反應時間之生質柴油產率.....	92

圖 4-19	直接轉酯最適條件之生質柴油產率	93
圖 4-20	濕菌直接轉酯化之生質柴油產率	95
圖 4-21	比較兩步驟轉酯化與直接微波轉酯化之生質柴油產率.....	97
圖 4-22	不同微波功率之生質柴油產率	99
圖 4-23	不同微波時間之生質柴油產率	101
圖 4-24	不同甲醇比例之生質柴油產率	103
圖 4-25	不同催化劑濃度之生質柴油產率	105
圖 4-26	微波轉酯最適條件之生質柴油產率	106
圖 4-27	濕菌微波轉酯化之生質柴油產率	108

表目錄

表 2-1	生質柴油與石化柴油標準之比較 (Lotero et al.,2005)	6
表 2-2	粗甘油微量元素分析表(Thompson et al., 2006).....	8
表 2-3	Oil content of some microorganisms	16
表 2-4	Lipid composition of some microorganisms (Yang et al., 2009)	17
表 3-1	實驗藥品清單	26
表 3-2	實驗儀器清單	28
表 3-3	種子培養基	33
表 3-4	發酵培養基	34
表 4-1	5 L 氣舉式發酵槽添加 2.5 %廢棄食用油之動力學參數變化	60
表 4-2	100 L 氣舉式發酵槽之動力學參數變化	62
表 4-3	金屬工業研發中心超高壓破壁萃取油脂	65
表 4-4	不同甲醇量經超音波破壁與直接萃取油脂回收率之比較	68
表 4-5	經超音波破壁添加不同甲醇量萃取油脂回收率之數據	70
表 4-6	經超音波破壁添加不同水量萃取油脂回收率之數據	72
表 4-7	不破壁添加不同甲醇量直接萃取油脂回收率之數據	74
表 4-8	不破壁添加不同水量直接萃取油脂回收率之數據	76
表 4-9	不破壁直接萃取之不同萃取時間油脂回收率之數據	77

表 4-10	不同甲醇量經超音波破壁與直接萃取油脂回收率之比較.....	78
表 4-11	不同含水量經超音波破壁與直接萃取油脂回收率之比較.....	79
表 4-12	不同超高壓處理樣品 FAME 分析結果.....	81
表 4-13	兩步驟轉酯化與直接轉酯化之數據.....	83
表 4-14	不同反應時間之數據.....	85
表 4-15	不同溫度之數據.....	86
表 4-16	不同甲醇比例之數據.....	88
表 4-17	不同催化劑含量之數據.....	90
表 4-18	最適條件比較反應時間之數據.....	92
表 4-19	直接轉酯最適條件之數據.....	93
表 4-20	濕菌直接轉酯化之數據.....	95
表 4-21	兩步驟轉酯化與直接微波轉酯化之數據.....	97
表 4-22	不同微波功率之數據.....	99
表 4-23	不同微波時間之數據.....	101
表 4-24	不同甲醇比例之數據.....	103
表 4-25	不同催化劑含量之數據.....	105
表 4-26	微波轉酯最適條件之數據.....	106
表 4-27	濕菌微波轉酯化之數據.....	108

表 4-28	比較直接轉酯化與微波轉酯化之數據.....	110
表 4-29	轉酯化製程實驗與文獻之比較.....	111

第一章 緒論

由於石化燃料易產生二氧化碳、其他氮化物及硫化物等有毒物造成環境汙染，且石油終有耗盡之虞，為尋求永續可再生替代能源，近幾年促成生質能源產業快速崛起生質能源屬再生能源，具有環境保護與能源生產的雙重效益，其中極具有潛力者為生質柴油。

生質柴油是具有發展性的替代生物燃料之一，在政策的推波助瀾之下，短短不到十年內，生質燃料已歷經四代的演變。對於台灣而言，地理位置四面環海的環境限制下，所能利用的生質柴油來源也受侷限，第三代生質燃料目前利用細菌、酵母菌與微藻等富含油脂的微生物進行發酵成，透過這類最低階的單細胞群體，可以產出生質柴油、酒精、甲烷、氫氣、合成氣等，是目前的研究方向。至於第四代生質燃料，係以基因重組的細菌捕捉空氣中的二氧化碳進而轉換成燃料，仍屬研究階段，尚無實際產出。

在製造生質柴油的過程中，會產生副產物-粗甘油，而其中含有 40 %至 70 % 甘油、0 %至 10 %的鹽、8 %至 50 %的水分及低於 5 %甲醇和 0.5 %脂肪酸 (Stelmachowski, 2011)，為一種廢棄物。而本實驗所使用菌株，黏紅酵母菌 (*Rhodotorula glutinis*) 是能迅速累積高油脂的菌株，其生長快速且能以廢棄物粗甘油作為碳源，兼具環保價值，本研究利用此菌株內含高油脂之特性，將其當成生質柴油的料源。

第二章 文獻回顧

2.1 生質柴油

柴油引擎 (diesel engine) 由德國工程師 Rudolf Diesel (1858-1913) 發明設計，將其所使用燃料稱為柴油 (diesel oil)，且在巴黎博覽會上，展示了使用花生油作燃料的發動機。但隨著石油大量的開採、低成本及適用於任何機械的特性，促使生質燃料製備的研究隨之停擺。直到世界石油危機和環保意識的高漲，使得生質柴油等替代能源的研究逐漸受到重視。生質柴油的研究推廣是從 20 世紀的 70 代開始，由德國、美國、法國、義大利等相繼成立了專門的生質柴油的研究機構。到了 20 世紀的 90 年代，歐盟訂定發展生質能政策、法規、指令與優惠手段，例如歐盟 2003/30/EC 號指令「生質能用量佔燃油用量於 2005，需達 2% 至 2010，需達 5.75% 目標」品質需符合 EN 14214。美國也在 1990 年開始以小規模，利用產製豆粕副產物大豆油生產生質柴油，進行推廣應用，美國能源部要求到 2010 年止，美國的生質柴油產量從現有的 100 萬噸提高到 1200 萬噸，使生質柴油迅速成為新經濟的產業之一 (許惠美, 2000)。

目前國內原本實行的 B2 生質柴油政策(98%化石柴油+2%生質柴油)雖因油路堵塞暫時停止，問題之根本為國內生質柴油公司以廢棄食用油作料源生產的生質柴油品質所造成，而非生質柴油政策方向錯誤，否則全球生質柴油生產不會持續成長，如圖 2-1。

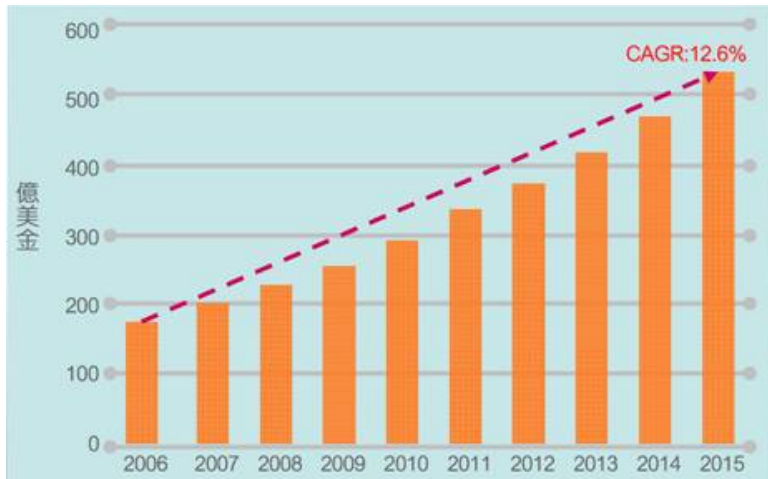


圖 2-1 全球生質燃料市場產值預測

原本預計 2015 年推動 B5 政策若重新啟動，全國的生質柴油需求量將高達 25 萬公秉，依據環保署 2014 年資料，國內廢食用油僅約 2 萬 6 千噸，顯然無法符合國內生質柴油料源的需求。無論是溫室氣體減量或尋求替代性能源，而生質柴油料源及相關製程之開發均有其必要性。如圖 2-2 為生質柴油、圖 2-3 為台灣所使用添加 2% 生質柴油的 B2。

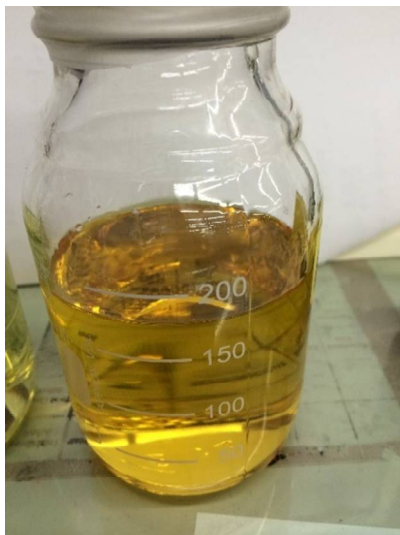


圖 2-2 生質柴油

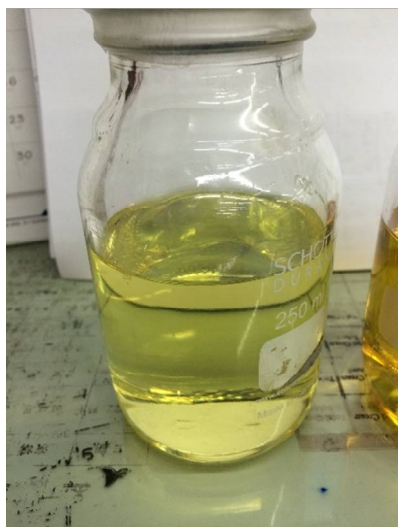


圖 2-3 在柴油中添加 2% 生質柴油的 B2

生質柴油是以取代石化柴油為目標的替代能源，利用轉酯化技術將植物油或動物油脂轉化為物理及化學性質都與烴類化合物相當類似的脂肪酸酯。相較於石化燃料其具有生物可降解性、無毒性、高潤滑性和高十六烷值，可混合石化柴油使用於常規的燃料發動機，並且不需要特殊修改引擎 (Ullah et al., 2014)。生質柴油的料源種類廣泛，舉凡向日葵油、大豆油、棕櫚油等植物油或是油炸過後的廢食用油都可作為生質柴油的原料。

2.1.1 生質柴油與石化柴油之比較

生質柴油是一種色澤呈現琥珀色 (Amber-yellow) 之液體，其特性與石化柴油相近，如表 2-1，是一種潔淨之替代燃料，亦可作為添加劑，以提高超低硫石化柴油 (Ultra-low sulfur petrodiesel) 之潤滑性。

生質柴油不含石化成分，除了可以單獨使用外，也可以一定比例混入石化柴油使用於既有或少許修改之柴油引擎。混合後之柴油係以 BXX 表示，其中之 XX 代表混合柴油中生質柴油之體積比率 (volume percentage)，例如 B100 表示純生質柴油，B20 則表示混合柴油中有 20% 之生質柴油、80% 之石化柴油。

相對於石化燃料，生質柴油是一種使用方便、無毒、生物可分解性之燃料，具有下列優缺點：

1. 燃燒後所產生氣體污染物除了氮氧化物 (NO_x, Nitrogen oxides) 稍微增加外，其他如微粒子 (Particulates)、一氧化碳 (Carbon monoxide)、碳氫化合物 (Hydrocarbons) 及有毒氣體都減少許多。
2. 芳香族烴碳氫化合物 (Aromatic hydrocarbons) 含量低，相對於石化燃料 Benzofluoranthene 減少 56%，Benzopyrenes 減少 71%。
3. 生質柴油所含 16 烷數 (Cetane Number) 較高，可達 50 以上 (石化柴油為 42)，含有氧量 11%，可促進燃燒點火效果。
4. 閃火點 (Flash point) 較高，為 118°C (石化柴油 52°C)，以致著火安全性佳。
5. 生質柴油之熱量為 128,000 BTU/gal，較石化柴油之 130,500 BTU/gal 低，但其燃料消耗量與石化柴油略同。其運轉效率亦與石化柴油類同而無不及。

6. 在一個淨生命週期下 (Net lifecycle) 生質柴油的一氧化碳 (CO) 與二氧化碳 (CO₂) 排放量分別比石油燃料少 50%與 78%。(Sheehan et al., 1998)

表 2-1 生質柴油與石化柴油標準之比較 (Lotero et al.,2005)

比較項目	石化柴油	生質柴油
Standard	ASTM F975	ASTM D6751
Composition	HC (C10~C21)	FAME (C12~C22)
Kinematic viscosity (mm ² /s) , 40°C	1.9~4.1	1.9~6.0
Specific gravity (g/mL)	0.85	0.88
Flash point (°C)	60-80	100-170
Cloud point (°C)	-15 to 5	-3 to 12
Pour point (°C)	-35 to -15	-15 to 16
Water (vol %)	0.05	0.05
Carbon (wt %)	87	77
Hydrogen (wt %)	13	12
Oxygen (wt %)	0	11
Sulfur (wt %)	0.05	0.05
Cetane number	40-55	48-60
High Frequency Reciprocating Rig (µm)	685	314
Ball-on-cylinder lubricity evaluators cuff (g)	3600	>7000

2.1.2 生質柴油副產物-粗甘油

在環保意識高漲以及再生能源的倡導下，生質柴油的生產量快速提升，美國自 1998 到 2002 年間生質柴油的年產量由 0.8 萬公升提升到 121 萬公升，各國也同時在迅速發展，每年產量節節高升。然而在轉脂化的過程中，每產出 9 公斤的生質柴油，就伴隨著約 1 公斤的副產物粗甘油（Pachauri et al., 2006）。成了市場對傳統的甘油的價格變動，也因為在處理的難度造成顯著的环境問題（Oh et al., 2011），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、低量的硫化物、蛋白質及礦物質等，使得粗甘油在食品，製藥和化妝品工業上得花費昂貴的純化步驟（Eda et al., 2008）。

為了能有效的利用粗甘油，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。粗甘油之甘油組成占總重 95.3 % 一般以低價轉賣於甘油精煉廠，因為甘油的應用非常廣泛，可添加於化妝品、食品、藥品或作為各種化學品生產的原料，由於粗甘油內含有甲醇、氫氧化鈉酯類，少量硫化物，蛋白質、微量元素（Thompson et al., 2006）等，因此純化的步驟難以避免花費成本偏高。

在微生物培養基中，細胞需要碳源來合成產物，在文獻指出，以粗甘油作為 *Pichia pastoris* 發酵培養基的碳源，所得到的細胞濃度及紅血球生成素是以純甘油作為發酵碳源的 1.4 倍，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（Eda et al., 2008），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。除此之外，粗甘油也可作為碳源用於生產高價值的化合物，如 1,2-丙二醇（Dasari et al., 2005），聚脂纖維（Stumbe et al., 2004），聚甘油（Clacens et al., 2002）。

表 2-2 粗甘油微量元素分析表(Thompson et al., 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。

2.1.3 產製生質柴油之方法

生質柴油主要為將動、植物油脂或廢食用油中較大分子的飽和或不飽和脂肪酸類轉化成較小分子的脂肪酸酯，使其性質和柴油相類似，以改善上述的問題，其中的技術方法有很多種，較常被提及的有混合稀釋、微乳化法、熱裂解法以及轉酯化法。

I. 混合稀釋

混合稀釋係直接將植物性油脂與柴油混合使用，是最簡單也是最方便之方法，但長時間使用下來還是會產生引擎積碳、噴嘴阻塞等問題 (Pestes et al.,1984)。

II. 微乳化法

微細乳化是利用添加低燃點之揮發性液體來改善噴霧效果之方法 (Goering et al., 1982，其缺點是會降低十六烷值，並影響燃燒效率。

III. 熱裂解法

熱解是將植物油中巨大分子結構分解成較小之分子結構 (Niehaus et al.,1986；Schwab et al.,1987)，可以提升熱值與十六烷值，並降低黏度，由於其程序複雜，成本過高，並不是一種很好之方法。

IV. 轉酯化法

轉酯化反應是利用觸媒將三酸甘油酯 (油脂的主要成分) 與醇類反應生成直鏈的脂肪酸單酯，所使用的觸媒可包括鹼觸媒、酸觸媒與生物觸媒(Freedman et al.,1986)。

綜合考量系統操作性、安全性、經濟性等因素，上述四種方法中以轉酯化方法最佳，具有轉化率較高與反應時間較短等優點，是已商業運轉之生質柴油生產

工廠中最常見之方法，其中又以使用酸性或鹼性化學物質作為催化劑最為普遍。

其反應式如圖 2-4、2-5。

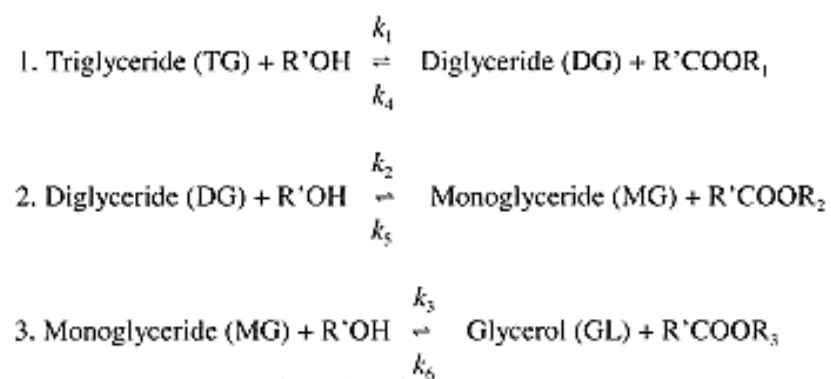


圖 2-4 酯化反應式(Freedman et al.,1986)

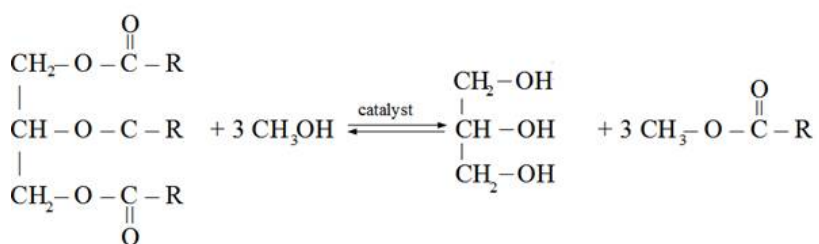


圖 2-5 轉酯化反應式(Fukuda et al.,2001)

2.2 直接轉酯化反應

目前常用的方法有稀釋、熱分解、微乳化以及轉酯等方法，前三種方式過程比較繁瑣且成本高，因此，轉酯化技術是製造生質柴油目前最常用最成熟的的方法。

生物柴油來自微生物油的傳統生產方式需要三個主要步驟：細胞破碎、萃取油脂和脂質轉酯化。首先，微生物必須先培養至靜止期，收集菌體並乾燥後，再以機械性或非機械性步驟破壞細胞壁使脂質釋出。釋出之脂質再以有機溶劑如正己烷、庚烷或混合之有機溶劑如正己烷/甲醇或氯仿/甲醇進行萃取。最後，萃取出之脂質再以鹼(NaOH or KOH)或酸(HCl or H₂SO₄)為催化劑，與甲醇或乙醇進行轉酯化。

單細胞油脂(single cell oil, SCO)作為生質柴油料源雖有下列敘述之優點，但仍有成本上之問題因此無法商業化。因此，若能簡化 SCO 生產生質柴油之步驟，將能有效降低成本，更接近商業化之目標。

直接轉酯化係將脂質萃取及轉酯化同步進行，此新穎的一步反應過程用於生物柴油生產，簡化了對於萃取油脂的過程，否則此過程將會是瑣碎繁雜的步驟(Thliveros et al.,2014)，可取代傳統 SCO 生產生質柴油方式，甚至是以未完全乾燥之菌液進行直接轉酯化，由於省略了乾燥菌液、破菌及脂質萃取之前處理步驟，除了節省能源及減少有機溶劑使用外，亦能有效降低生產成本。

2.2.1 直接鹼催化轉酯化反應

以鹼催化最大優勢為反應速度快，較以酸為催化劑者快 4000 倍，於 40-65 °C 下反應數小時即可達到高度轉酯化(Fukuda, H et al.,2001)。此法最大之缺點為當料源中含有過多之游離脂肪酸時即會產生皂化，皂化反應會消耗觸媒，降低產

率，使產物之分離困難；原料油中含水量過高亦會使皂化更易發生。

SCO 通常被認為含有較多之游離脂肪酸，但文獻中的游離脂肪酸含量卻十分有限(Thliveros, P et al.,2014)。Thliveros 等人發展一新穎生質柴油生產方法，將含油酵母菌 *Rhodosporidium toruloides* Y4 以鹼直接進行轉酯化。以 NaOH 作為催化劑，探討催化劑濃度、溫度、時間、甲醇量及含水量對酯化效率之影響。最佳前處理條件為 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 及乾燥生物質/甲醇比 1:20 (w/v)於常壓下 50°C 反應 10 h，脂肪酸甲酯產率為 97.7%。此種直接催化 *R. toruloides* 生物質方法較傳統方法為簡單、省時，還可得到較佳之脂肪酸甲酯產率。此研究顯示使用鹼催化進行直接轉酯化有其可行性，而過去使用鹼催化無法成功可能跟催化劑使用過多及反應溫度過高有關。

2.2.2 直接酸催化轉酯化反應

由於擔心鹼性催化劑與游離脂肪酸產生皂化，SCO 轉酯化通常利用酸性催化劑如 HCl 或 H_2SO_4 進行。Liu 及 Zhao 曾比較酸及鹼對 *Lipomyces starkeyi* 進行直接轉酯化。於 70°C 下以鹼催化，反應十分緩慢且 FAME 產率低於 20%。作者懷疑於無水狀態下酵母菌細胞壁不易分解，但添加水分後又產生皂化現象，因此放棄鹼催化改採酸催化，研究中針對操作參數如甲醇添加量、催化劑濃度、反應溫度及時間進行最適化。於 70°C 於常壓下反應 20 小時，乾燥生物質/甲醇比 1:20 (w/v)，以 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 或 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 催化，產率可達 98%。產出生質柴油十六烷值估計介於 56 至 59。此種整合生產方式可省去繁瑣及耗時之脂質萃取程序(Liu, B et al.,2007)。

Vicente 等人測試含油黴菌(*Mucor circinelloides*)以三種不同萃取系統萃取脂質之效率：chloroform: methanol、chloroform: methanol: water、*n*-hexane。生質柴油利用酸性催化劑以兩種不同方式生成生質柴油：萃取脂質後轉酯化及直接轉酯

化。反應於 65°C 下進行 8 小時，以 BF_3 、 H_2SO_4 、 HCl 為催化劑，直接轉酯化生成之脂肪酸甲酯之純度(三種催化劑均超過 99%)較萃取脂質後轉酯化為高(91.4%~98%)。此外直接轉酯化生質柴油產率明顯較高，主要因為酸性催化劑存在時脂質萃取效率較佳(Vicente et al.,2009)。

2.2.3 濕菌轉酯化

用於藻類生產生質柴油，大多數傳統方法涉及單獨的脂質萃取步驟或需要使用乾生物質，而干燥步驟產生額外的成本和能量的消耗，因此以未乾燥之生物質轉酯化有研究的必要。

Cao 等人應用一步法直接將為除水之小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)，含水量約 90%，直接轉酯化為生物柴油。為了研究水分對生產生質柴油的影響，將蒸餾水加入到干燥的微藻生物質中，形成用於生產生質柴油的濕生物質。結果顯示，在 90°C 較低溫度的條件下，水對於生產生質柴油有不利影響。當含水量由 0% 上升至 90%，生質柴油產量會由 91.4% 降至 10.3%。然而在較高的溫度下可以改善不利的影響，當溫度達到 150°C 時，生質柴油產量可超過 100%。基於上述研究，將濕微藻生物量直接用於生物柴油生產，並研究了最佳條件。在濕微藻生物量等重於乾微藻生物質 100mg 下，最佳條件添加 4mL 甲醇與 8mL 正己烷，0.5M H_2SO_4 於 120°C 下反應 180 分鐘，生質柴油產率高達 92.5%，FAME 含量為 93.2%。研究顯示，生質柴油可以從濕微藻生物質直接有效生產，這結果可能為生產生質柴油的製程帶來利益(Cao,H et al.,2013)。

Suh 等人研究了以通過乙醇對濕菌進行除水預處理後直接進行轉酯化的新方法。以藻類三倍體積之乙醇預處理濕生物質二次，於 80°C 下溫和酯化 30 分鐘，可使脂肪酸乙酯 (FAEE) 從 3.04mg 到 11.78mg，產率增加近四倍，當將乙醇以十倍體積除水後，FAEE 從 3.18mg 增加到 18.29mg，產率增加六倍。當酯化反應

在 120°C 高溫下且持續 2 小時，FAEE 產率可進一步增加。預處理步驟對此製程於溫和條件下提生產率之效果較為明顯，可有效降低成本且節約能源(Suh, W et al.,2015)。

2.3 微波原理及轉酯化

2.3.1 微波原理

微波是一種以電磁波形式存在的能量，為非游離性輻射，其能量介於紅外光與無線電波之間，頻率範圍約由 300MHz-300GHz 之間，微波頻率比一般的無線電波頻率高，通常也稱為「超高頻電磁波」。微波的基本性質通常呈現為穿透、反射、吸收三個特性。對於玻璃、塑料和瓷器，微波幾乎是穿越而不被吸收。對於水和極性化學物質等就會吸收微波而使自身發熱。而對金屬類東西，則會反射微波。

一般廣用的微波爐即是使用頻率 2450MHz 的微波。在正常自然狀態下，物質內的偶極分子沒有規則的排列，當以這樣的微波場作用於液態極性分子，其內部偶極分子會重新排列，它在快速變化的高頻電磁場作用下，其極性取向將隨著外電場的變化而變化。造成分子的相互摩擦運動的效應，分子間產生高速碰撞和摩擦於是產生高熱，此時微波場的場能轉化為介質內的熱能，使物料溫度升高。

2.3.2 微波轉酯化

使用非傳統方法，即微波進行萃取藻類的脂質(小球藻)與同步轉酯化，使用乙醇作為溶劑。由於微波具有獨特的增強(熱和非熱)機制，可以成功的在非常短的反應時間內，同時幫助萃取藻類脂質和轉酯化反應的進行。

Martinez 等人提出了關於微波對藻類生物柴油生產的影響研究下條件。經過實驗研究確定最佳微波轉酯化為 1:12 藻類/乙醇(w/v)或 1:500(莫耳比); 2wt%

催化劑，在 350W 的微波功率反應 5-6 分鐘的條件下，脂肪酸乙酯 (FAEE) 的最高產量和轉化率分別為 18.8%和 96.2%，此實驗結果優於傳統的兩步驟萃取脂質後轉酯化，其產量和轉化率分別為 13.9%和 78.1% (Martinez-Guerra ,E et al.,2014)。

2.4 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，導致成本高昂且需大面積之可耕地，可能造成糧食衝突。因此，部分研究改採非糧食作物如麻瘋樹油或廢食用油做為料源，嘗試解決前述之問題。而近年來，以微生物內含油脂做為料源成為生質柴油研究之重點。

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。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，微生物生產的油脂相較於動植物油脂，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 (Subhash et al., 2011)。如表 2-3 為微生物可累積的油脂比例。

表 2-3 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

2.4.1 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, SCO) (Liu et al., 2014)，產油真菌 (oleaginous fungi) 之中，產油酵母是最早受到矚目的類群，近年來產油絲狀真菌由於具備下列優勢：(1) 油脂轉化後，其組成接近現有生質柴油之規格；(2) 以菌絲體之型態生長，易於回收；(3) 可利用多樣之有機廢棄物為培養基質，助於環保減廢並降低生產成本；(4) 適合發展固態發酵製程，減少設備的支出與水資源的使用；因此，近年來逐漸受到重視。

大部分微生物油的脂肪酸組成和一般植物油相近，如表 2-4，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，微生物油脂技術不斷取的進展。

表 2-4 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	-

2.5 微生物產油機制

一般而言，油質性微生物產油的要素可分為兩部分 (Ratledge., 2004)：

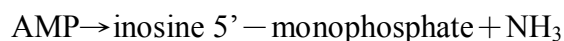
- I. 能連續的提供細胞為了產生脂肪酸合成酵素所需的前驅物：acetyl-CoA。
- II. 能充分地提供脂肪酸合成過程中所需的還原劑：NADPH。

以下分別簡述 acetyl-CoA 及 NADPH 的生成機制：

acetyl-CoA

1. 培養基中碳源充足，其他營養成分，特別是氮源缺乏，在這種情況下，微生物不再進行細胞繁殖，而是將過量的碳水化合物轉化為脂類，此時細胞內 AMP deaminase 活性上升。

2. 產油微生物的 AMP 脫氨酶活性增加，AMP 脫氨酶將 AMP 大量轉化為 IMP 和氨，細胞內與粒線體中的 AMP 濃度下降。



3. 由於 AMP 濃度下降，isocitrate dehydrogenase 也跟著停止運作因此，三羧酸 (TCA) 循環陷入低迷狀態，代謝路徑發生改變。

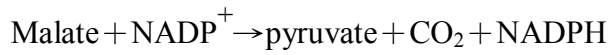
4. isocitrate dehydrogenase 的停止，造成 isocitrate 無法被代謝而且藉著 Aconitase 與 citric acid 達成平衡。

5. 因此 citrate 得以累積於粒腺體內，而足夠的 citrate 進入細胞質後，被 ATP:citrate lyase 切斷產生了 acetyl-CoA 和 oxaloacetate。



II. NADPH

首先由 Malate dehydrogenase(MDH)還原成蘋果酸，在 Malic enzyme (ME) 作用下氧化脫羧得到丙酮酸，並釋放 NADPH:



以上文字敘述可由圖 2-6 表示：

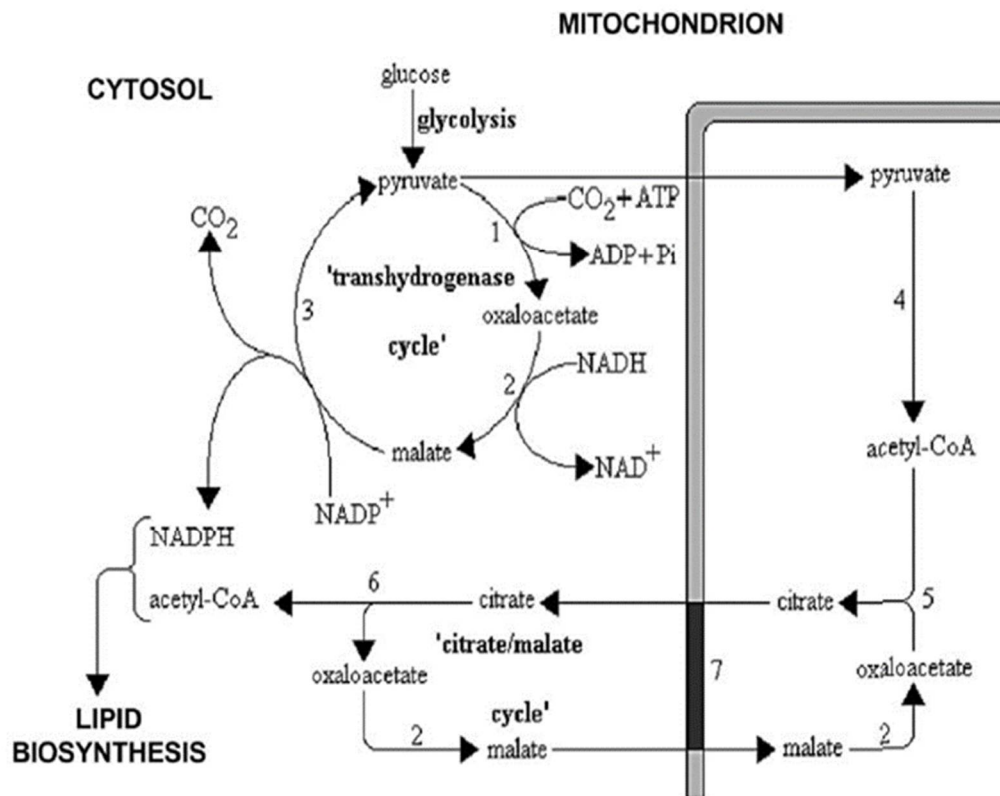


圖 2-6 檸檬酸循環代謝圖 (Ratledge., 2004)

綜合以上，可由圖 2-6、2-7 表示整個油脂的累積機制：

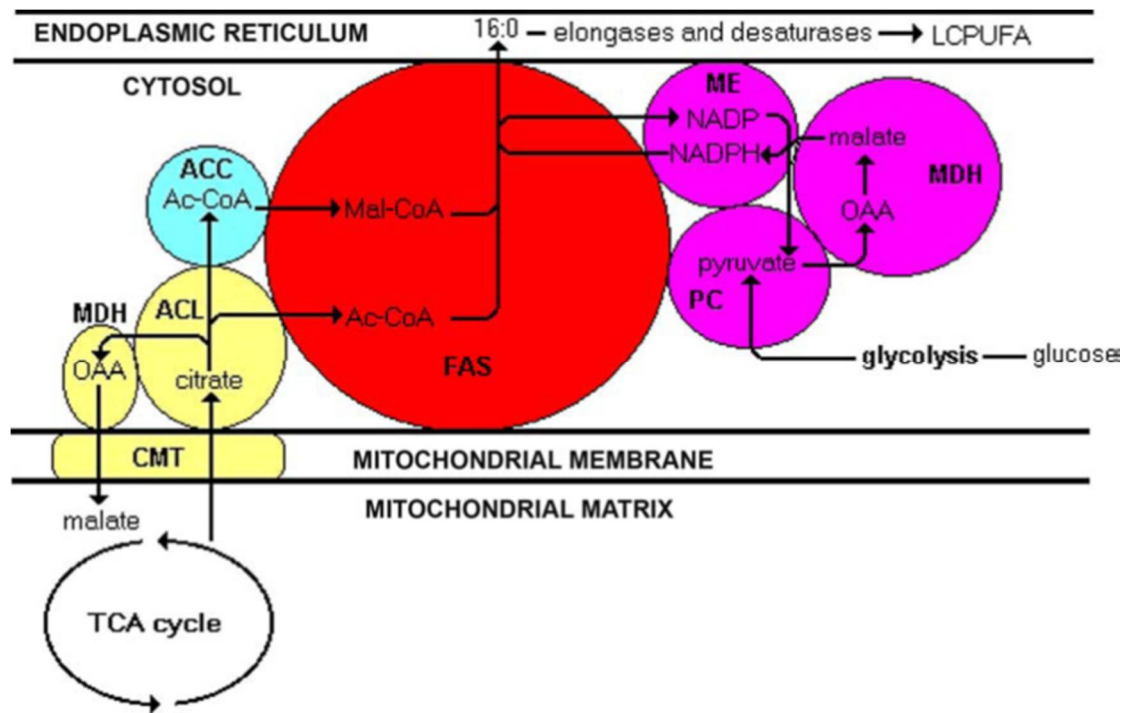


圖 2-7 脂肪酸累積代謝圖 (Ratledge., 2004)

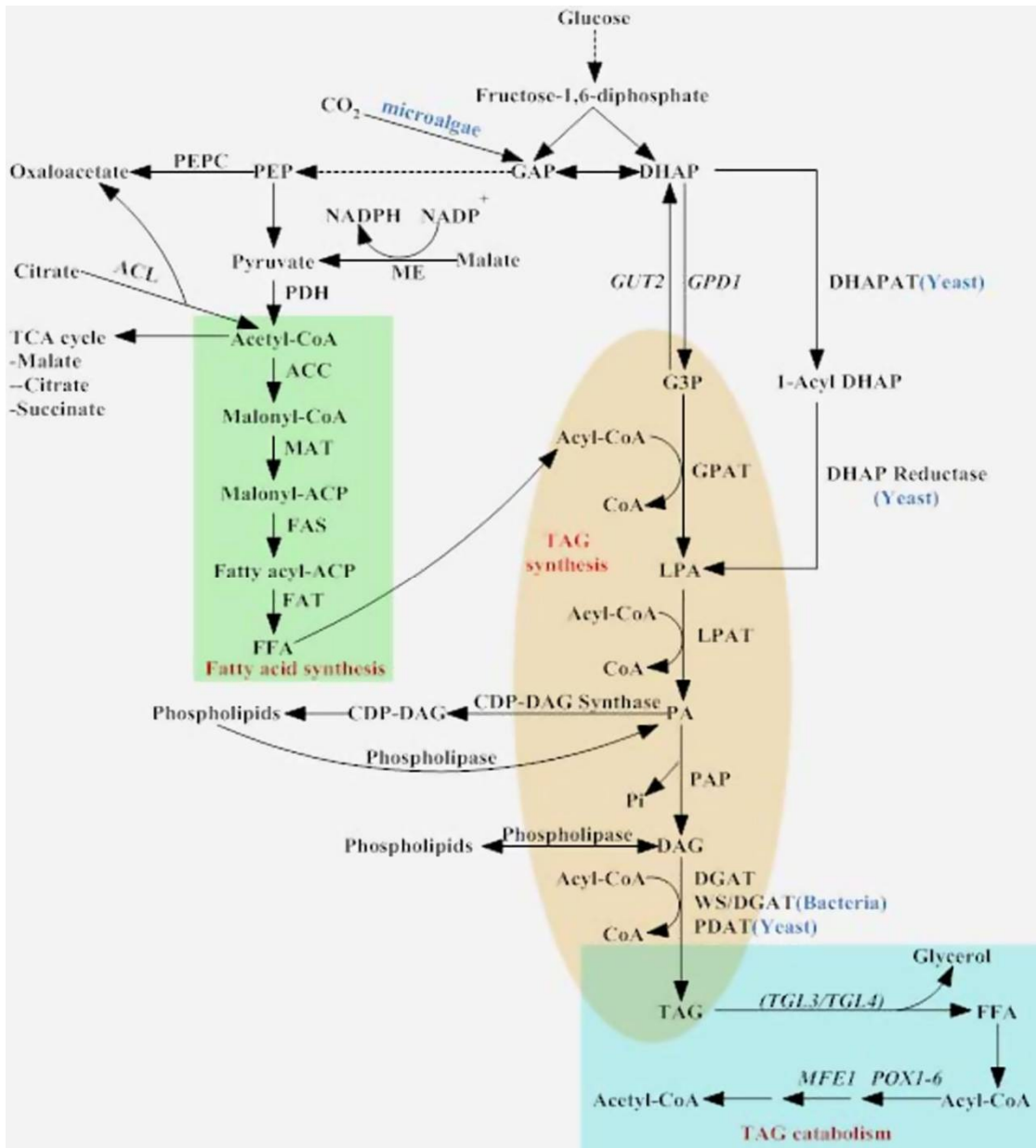


圖 2-8 The fatty acid and TAG biosynthesis pathway in microorganisms.(Liang et al., 2013)

2.6 不同萃取微生物油脂方法

首先，微生物必須先培養至靜止期，收集菌體並乾燥後，利用機械方式、化學方式、其他方進行萃取油脂。

微生物體積小，不易以擠壓方式取出油脂；所以目前常用的方法之一，是以機械性或非機械性步驟破壞細胞壁使脂質釋出。釋出之脂質再以有機溶劑如 hexane、heptane 或混合之有機溶劑如 hexane/ethanol 或 chloroform/methanol 進行萃取。將其不飽和脂肪酸及油脂萃取出來，再以轉酯化流程，即一般生質柴油製造方式，做成生質柴油(Johnson and Wen, 2009；Ehimen et al., 2010；Halim et al., 2011)。

微生物萃取的二項瓶頸:(1)菌體是否有經過前處理(即，菌體破壁)；(2)菌體本身所含水份。亦即是：當菌體若是沒經過破壁時，油脂萃取率不高；另外，當菌體所含水份越高，將有礙於油脂萃取之效率。將油脂萃取方法整理成三大類：機械方式、化學方式、其他方式，如下所示(Lee et al.,2010)：

I. 機械方式：

- 高壓均質/高速均質法(Expression/Expeller press)
- 超音波輔助萃取法(Ultrasonic-assisted extraction)
- 珠磨技術(bead beating)

II. 化學方式：

- 正己烷萃取法(Hexane Solvent Method)
- 溶劑萃取法(Solvent extraction)
- 次/超臨界流體萃取法(Supercritical fluid Extraction)

2.7 紅酵母菌 (*Rhodotorula*)

Harrison 於 1928 年確立紅酵母菌種，這種被稱為粉紅酵母的類酵母普遍存在於自然界，1970 年，Phaff 和 Ahearn 從鮮花、海洋動物蝦類的體表和腸道及印度洋和大鹽湖、沼澤地帶等生態環境中分離出紅酵母；台灣目前已有 16 屬 70 種酵母菌的紀錄，其中以 *Candida*、*Cryptococcus*、*Pichia*、*Rhodotorula*、*Saccharomyces*、*Sporobolomyces* 與 *Zygosaccharomyces* 為主要菌屬(汪碧涵., 2014)，紅酵母屬的特徵是：細胞呈現球形、卵圓形，細胞的直徑為三至五微米，有明顯的紅色或黃色色素，且有些菌種因形成莢膜而使菌落呈粘質狀，如粘紅酵母，而在生殖方面行多極出芽生殖(multilateral budding)，不形成子囊孢子或擔孢子(劉懿嫻., 2014)。

一般以往對酵母菌最廣為人知的用途是應用於啤酒或麵包的發酵，除此之外紅酵母菌還能利用於保健食品所需的蝦紅素 (Montanti et al., 2011)、類胡蘿蔔素 (Meng et al., 2009) 等，因其富含高油脂累積也可用於生產微生物油脂 (Cortes et al., 2014)。

2.7.1 菌種選擇-*Rhodotorula glutinis*

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(余依嫻, 2012)。是一種好氧性菌體，在外觀上，細胞的型態呈卵圓形，菌落為紅色，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，而粘紅酵母菌所累積的油脂中不飽和脂肪酸所佔的含量高達 72 % 以上，主要以油酸(C18:1)佔 50~60 %、棕櫚油(C16:0)佔 20~30 %，且類似於植物油，因此適合作為製造生質柴油的油脂，微生物發酵產油對於未來能源的發展具有相當大的潛力，並且 *R. glutinis* 的單細胞有較快速的生長速度以及能利用低成本發酵培養基的特色，與藻類相比具有當地優勢(Suntornsuk et al., 2008)。

2.8 發酵策略

2.8.1 批次微生物油脂發酵

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，是必要的研究程序。

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 *Rhodotorula glutinis* (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 22360。

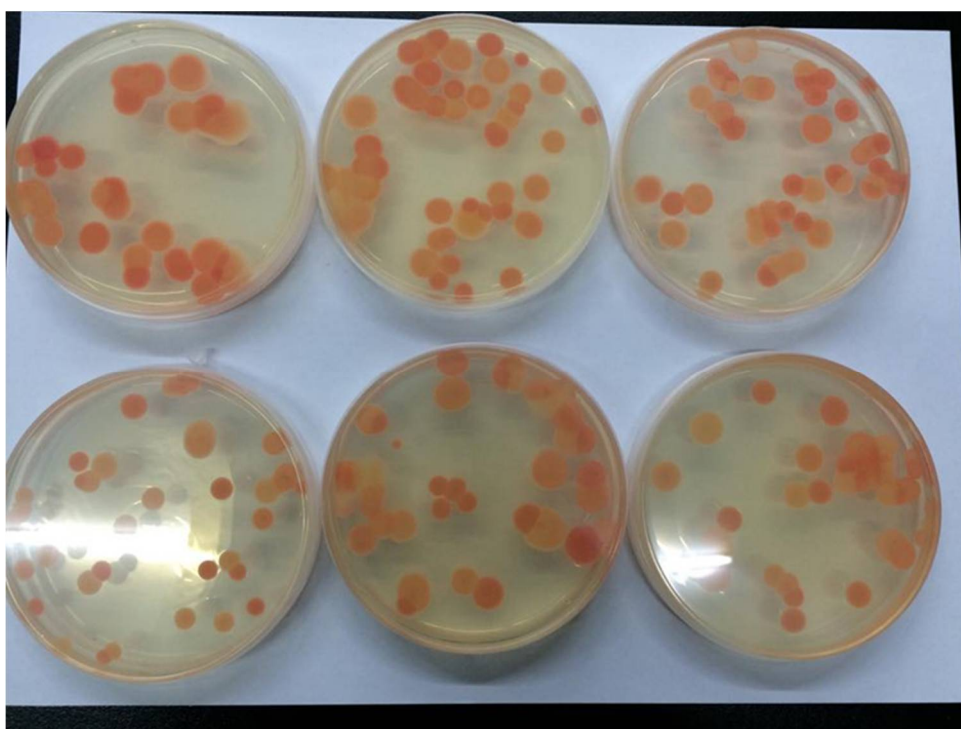


圖 3-1 *Rhodotorula glutinis*

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
粗甘油	Crude glycerol	又華股份有限公司
廢棄食用油	Recycle oil	-
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
乙醇	Ethanol	ECHO

氯仿	Chloroform	Seedchem
界面活性劑	Tween 80	ECHO
正己烷	n-Hexane	ECHO
乙酸乙酯	Ethyl acetate	ECHO
醋酸	Acetic acid	SHOWA
脂肪酸甲酯標準品	F.A.M.E. Mix C8-C24	SIGMA
十七烷酸甲酯	Methyl Heptadecanoate	SIGMA

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
三點式電磁加熱攪拌器	HONG YU	HMS-213
微波爐	TECO	YM3101CB
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	
100 公升攪拌式發酵槽	Biotop	
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
高效液相層析儀 RI detector	Hitachi	RI 5450
高效液相層析儀 Pump	Hitachi	L-2130/ 5110
高效氣相層析儀 FID detector	Thermo	Focus GC
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
斜立式真空減壓濃縮機	EYELA	n-1000
耐蝕型隔膜乾式幫浦	ULVAC	DTC-21

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 葡萄糖濃度分析方法

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，取上清液並稀釋 10 倍後，以 0.22 μm 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) 分析葡萄糖濃度，分析條件：管柱 87H3 (ICE-99-9861, 300 mm \times 7.8 mm, Taiwan)，移動相為 0.008 N H₂SO₄，流速 0.6 mL/min，注射量 30 μL 。

3.3.3 甘油分析方法

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，取上清液並稀釋 10 倍後，以 0.45 μm 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 N50DS, 250 mm \times 4.6 mm, Taiwan)，移動相為 0.01 N H₂SO₄，流速 0.4 mL/min，注射量 50 μL 。

3.3.4 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 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 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)。

3.3.5 超高壓細胞破壁萃取率(破壁率)

黏紅酵母菌(含水率 75%，甲醇/正己烷萃取凍乾菌體之含油率約 55%，參考圖 3-1 脂質含量萃取實驗結果)。

萃取率(破壁率)計算方式如下所示：

理論萃取物：菌體 $30\text{g} \times (1 - 75\% \text{含水率}) \times 55\% \text{含油率} = 4.125\text{g}$ 。

萃取率(破壁率)計算方式為： $[\text{萃取物}(\text{g}) / \text{理論萃取物}(\text{g})] \times 100\%$ 。

每組 30g 實驗後，以正己烷/甲醇=2/1 進行萃取 1 小時，體積/原菌種=10/1。離心過取正己烷層，減壓濃縮移除正己烷，得到萃取物。

3.3.6 薄膜層析法 (TLC)

將油相樣本離心 5 min (8200×g)，將雜質分離。取上清液 100 μl 混合 500 μl hexane 點於 TLC 片上。展開液為 hexane : ethyl acetate : acetic acid = 90:10:1 (v/v)。展開完成後噴上呈色劑(sulfuric acid : methanol = 1:1 (v/v))。置於烘箱中以 100°C

烘乾 5 min，使其呈色，以掃描器掃描存檔。

3.3.7 生質柴油組成及產率

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 μ l 注入 GC 分析。層析管柱為 Column InertCap FFAP(I.D. 0.25mm, Length 30m, df 0.25 μ 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：

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

ΣA ：C₁₆ 至 C_{18:3} 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)。

根據 Ani Idris 等人所發表的論文中以下列公式計算生質柴油產率：

$$\text{Yield (\%)} = \text{Produced biodiesel (g)} / \text{Initial crude oil weight (g)} \times 100\%$$

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

3.4.3 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。

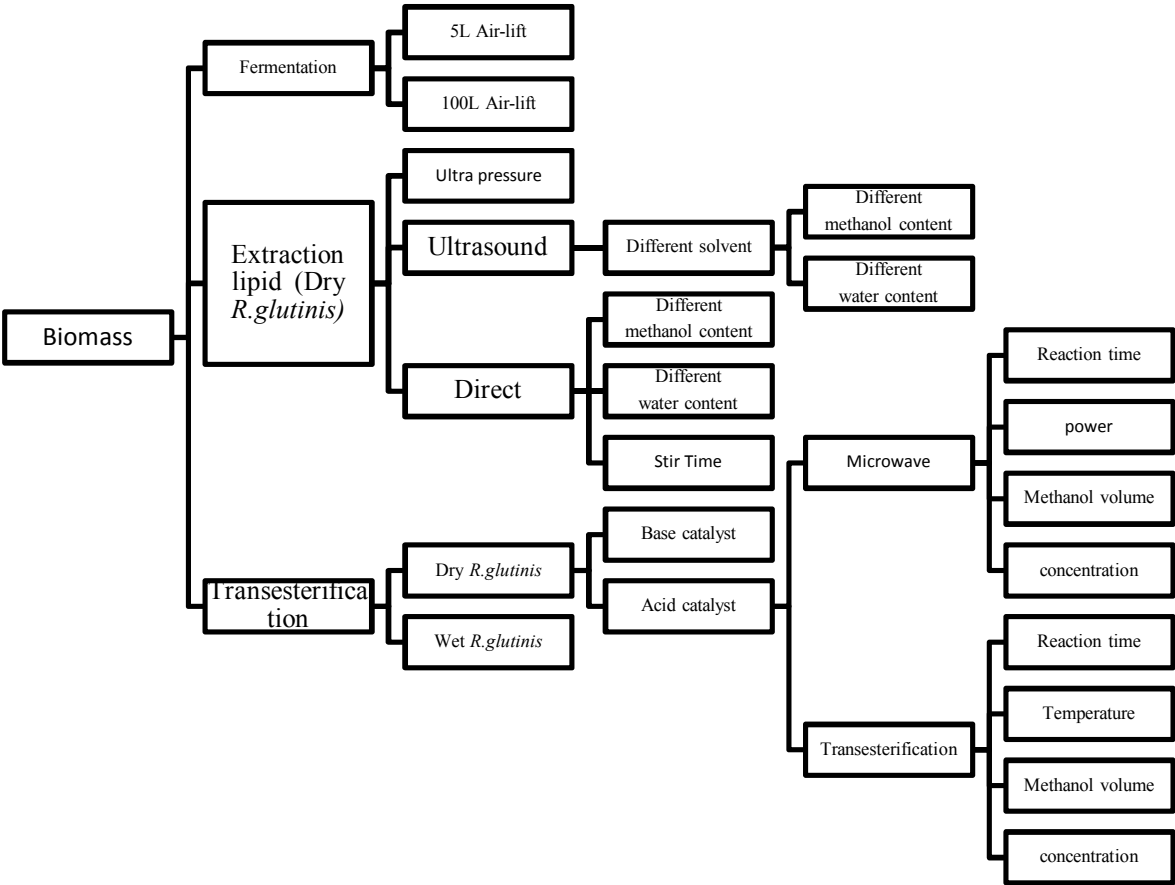
表 3-4 發酵培養基

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

3.4.4 接菌

將培養 48 hr 之 Seed medium 接至 Fermentation medium 中，搖瓶、5 L airlift 部分之接菌量為 Fermentation medium 10%之體積，100 L airlift 部分之接菌量為 Fermentation medium 1%之體積。

3.5 實驗架構



3.6 實驗方法

3.6.1 5L 氣舉式批次發酵程序 (Fermentation Experiments)

目的：收集菌體，進行萃取油脂與直接轉酯化之實驗

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 24 hr。
2. 以全 RO 水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 40 L 培養基，並添加 2.5 % 廢棄食用油與 1 g/L Tween80。
3. 接種 10 % SM 於上述培養基中。
4. 固定通氣量 1.5 vvm，並且以 3 N NaOH 控制 pH 5.5，及利用恆溫循環水槽控制溫度於 24 °C 等條件下進行培養。
5. 分別每 15 hr、9 hr 取樣一次。

3.6.2 100 L 氣舉式批次發酵程序 (Fermentation Experiments)

目的：收集菌體，進行萃取油脂與直接轉酯化之實驗

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 24 hr。
2. 以 RO 水作為溶劑，將其碳源換成葡萄糖，並依照表 3-4 配製 80 L 培養基。
3. 接種 1 % SM 於上述培養基中。
4. 固定通氣量 1.0 vvm，並且以 5 N NaOH 控制 pH 5.5，及利用恆溫循環水槽控制溫度於 24 °C 等條件下進行培養。

5. 分別每 15 hr、9 hr 取樣一次。

3.7 探討不同油脂萃取方式

3.7.1 超高壓破壁萃取油脂 (委託金屬工業研發中心協助進行實驗)

目的：嘗試新穎技術超高壓破壁前處理技術，對紅酵母菌濕料直接進行破壁和萃取，以期降低濕料乾燥能耗，達成高效脂質萃取目的，進一步轉酯化產製生質柴油。

採用金屬中心建置之超高壓水處理設備，測試條件：壓力 200~400MPa、常溫、時間 5~30min，升降壓次數 1~6 次、添加離子水(電解水)體積倍率 1~3 調整菌液濃度，進行濕菌細胞破壁。

3.7.2 超音波破碎萃取油脂

目的：利用超音波輔助破碎碎取菌體內脂質，比較不同有機溶劑脂萃取效果，更進一步探討使用的有機溶劑添加量與使用乾菌添加不同含水量，期望能達到降低有機溶劑的使用量，並進一步使用未完全乾燥之菌體進行萃取油脂，省略凍乾菌體的前處理步驟，大大降低能源的消耗，也利於後續的轉酯化反應的進行。

3.7.2.1 利用不同有機溶劑進行油脂萃取

目的：由於使用氯仿/甲醇當作溶劑來萃取紅酵母的油脂，因氯仿有其致癌性，且見光易被氧化成有毒光氣；或是使用正己烷/甲醇當溶劑，由於兩者之間會產生分相，如果要將萃油的製程放大，氯仿或是正己烷/甲醇並不是一個理想的溶劑，因此需找尋可以代替之溶劑，其萃油效果不低於氯仿/甲醇或是正己烷/甲醇。

秤取冷凍乾燥後的菌體 50 mg，分別添加以下不同有機溶劑 5 ml 進行萃取：

- (1) 氯仿/甲醇(2:1)
- (2) 正己烷/甲醇(2:1)
- (3) 正己烷/甲醇(1:1)
- (4) 氯仿
- (5) 甲醇
- (6) 乙醇

固定添加溶液體積為 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 125 Watt，作用時間 3 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，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)，重複以上步驟進行三重複。

以傳統的有機溶劑，氯仿/甲醇(2:1)萃取油脂結果當作對照組，並與不同溶劑萃取效果做比較，其油脂回收率計算方式如下：

$$\text{油脂回收率} = \frac{\text{其他有機溶劑之油脂萃取率}(\%)}{\text{對照組氯仿/甲醇}(2:1)\text{之油脂萃取率}(\%)} \times 100\%$$

3.7.2.2 添加不同甲醇量對於萃取油脂之影響

目的：找出菌體重與所需添加之最佳甲醇量便能萃取出菌體內油脂，以達到減少有機溶劑的使用量。

秤取冷凍乾燥後的菌體，重量固定為 50 mg，分別添加萃取液甲醇，添加體積為 1 ml 到 10 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，作用時間 3 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，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)，重複以上步驟進行三重複。

以不同有機溶劑進行油脂萃取結果，得到甲醇作為有機溶劑進行萃取效果最佳，因此以添加 5ml 甲醇萃取油脂結果當作對照組，並與添加不同甲醇量萃取效果做比較，其油脂回收率計算方式如下：

$$\text{油脂回收率} = \frac{\text{添加不同甲醇量之油脂萃取率}(\%)}{\text{對照組 5ml 甲醇之油脂萃取率}(\%)} \times 100\%$$

3.7.2.3 添加不同水量對於萃取油脂之影響

目的：對於使用未完全乾燥紅酵母為料源之直接轉酯化製程，其含水量對於油脂萃取的效果，進而會影響到轉酯化之製成，因此測試乾菌體添加不同水量對於萃取油脂之效果，找出可允許之含水量，使其萃取油脂效果與乾燥菌體相差不大，以便減少將菌液轉變成完全乾燥菌體的能耗。

秤取冷凍乾燥後的菌體 50 mg，固定甲醇體積為 5 ml，測試添加去離子水從 0 ml 到 1 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，作用時間 3 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，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)，重複以上步驟進行三重複。

以 5ml 甲醇不添加去離子水之油脂萃取結果當作對照組，並與另外添加不同去離子水量萃取效果做比較，其油脂回收率計算方式如下：

$$\text{油脂回收率} = \frac{\text{添加不同去離子水量之油脂萃取率}(\%)}{\text{對照組 5ml 甲醇之油脂萃取率}(\%)} \times 100\%$$

3.7.3 不破細胞壁直接進行油脂萃取

目的：對於直接萃取油脂而言，無須經過破壞細胞壁便能達到萃取油脂的效果，減少不必要的能源消耗，並探討菌重與添加之甲醇量比例以及乾菌體添加不同水量對於萃取油脂之影響，進而使用未完全乾燥紅酵母為料源進行直接萃取油脂並轉酯化之製程。

3.7.3.1 添加不同甲醇量對於萃取油脂之影響

目的：找出菌重與所需添加之最佳甲醇量便能萃取出菌體內油脂，以達到減少有機溶劑的使用量。

秤取冷凍乾燥後的菌體 50 mg，分別添加甲醇體積從 1 ml 到 10 ml 以玻璃瓶

裝著將菌粉跟溶劑混合均勻，並用磁石攪拌器直接萃取 1 hr (不考慮轉速之影響)，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，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)，重複以上步驟進行三重複。

以添加 5ml 甲醇直接萃取油脂結果當作對照組，並與添加不同甲醇量萃取效果做比較，其油脂回收率計算方式如下：

$$\text{油脂回收率} = \frac{\text{添加不同甲醇量直接萃取之油脂萃取率}(\%)}{\text{對照組 5ml 甲醇直接萃取之油脂萃取率}(\%)} \times 100\%$$

3.7.3.2 添加不同水量對於萃取油脂之影響

目的：對於使用未完全乾燥紅酵母為料源之直接轉酯化製程，其含水量對於油脂萃取的效果，進而會影響到轉酯化之製成，因此測試乾菌體添加不同水量對於萃取油脂之效果，找出可允許之含水量，使其萃取油脂效果與乾燥菌體相差不大，以便減少將菌液轉變成完全乾燥菌體的能源消耗。

秤取冷凍乾燥後的菌體 50 mg，分別添加去離子水從 0 ml 到 1 ml 以玻璃瓶裝著將菌粉跟溶劑混合均勻，並用磁石攪拌器直接萃取 1 hr (不考慮轉速之影響)，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，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)，重複以上步驟進行三重複。

以 5ml 甲醇不添加去離子水直接萃取之油脂萃取結果當作對照組，並與另外

添加不同去離子水量直接萃取之效果做比較，其油脂回收率計算方式如下：

$$\text{油脂回收率} = \frac{\text{添加不同去離子水量直接萃取之油脂萃取率}(\%)}{\text{對照組 5ml 甲醇直接萃取之油脂萃取率}(\%)} \times 100\%$$

3.7.3.3 不同萃取時間之影響

目的：對於萃取的時間，當然是能在越短的時間內，達到最大的萃取效果視為最佳，因此探討不同時間下對於萃取油脂之效果。

秤取冷凍乾燥後的菌體 50 mg，添加甲醇體積 5 ml，以玻璃瓶裝著將菌粉跟溶劑混合均勻，並用磁石攪拌器直接萃取 30min、1 hr、2hr 以及 3hr (不探討轉速之影響)，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，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)，重複以上步驟進行三重複。

以 5ml 甲醇直接萃取時間為一小時之油脂萃取結果當作對照組，並與其他不同直接萃取時間之效果做比較，其油脂回收率計算方式如下：

$$\text{油脂回收率} = \frac{\text{不同時間直接萃取之油脂萃取率}(\%)}{\text{對照組 5ml 甲醇直接萃取 1hr 之油脂萃取率}(\%)} \times 100\%$$

3.8 利用乾燥黏紅酵母菌直接轉酯化

目的: 直接轉酯化係將脂質萃取及轉酯化同步進行, 可取代傳統 SCO 生產生質柴油方式, 如圖 3-2、3-3, 由於省略了破菌及脂質萃取之步驟, 除了節省能源及減少有機溶劑使用外, 亦能有效降低生產成本。

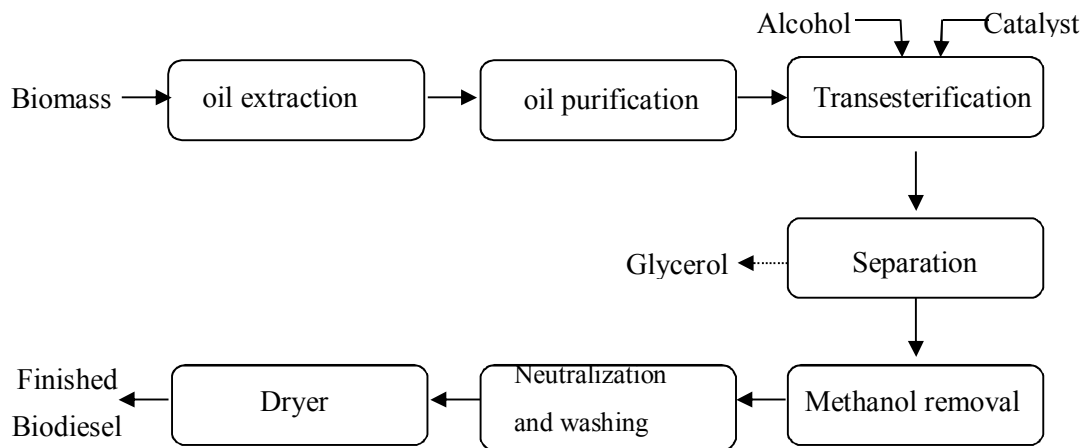


圖 3-2 以微生物油脂生產生質柴油之傳統程序(Hidalgo et al.,2013)

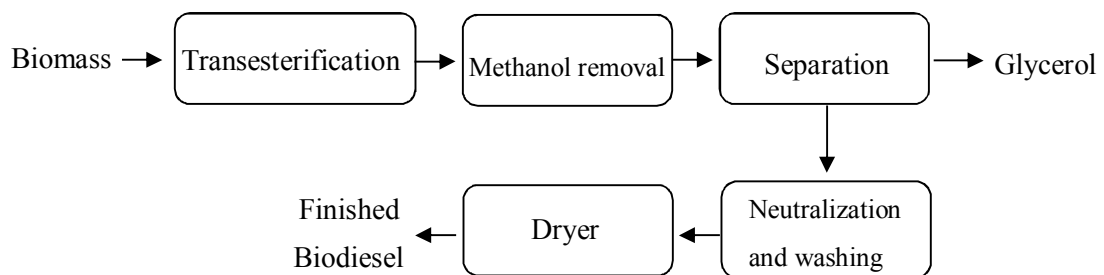


圖 3-3 以微生物油脂生產生質柴油之直接轉酯化程序

3.8.1 鹼催化轉酯反應

目的:以鹼進行直接轉酯, 分析催化劑濃度、溫度、時間、甲醇量及含水量等參數對 FAME 轉化率的影響(雖然直接轉酯化通常以酸性催化劑進行), 但

Thliveros 等人之研究指出，在適當催化劑添加量及反應溫度下，鹼催化是可行的)。

金屬中心以直接添加甲醇 100ml 於超高壓水同步處理，測試是否能直接進行轉酯化。另一實驗則是以金屬中心不同超高壓破壁萃取處理之樣品進行鹼催化。轉酯條件：配好濃度 2g/L NaOH 之甲醇，添加已配好的 NaOH 之甲醇數毫升，並加入純的甲醇，配成甲醇體積都固定 10 mL 而含不同量之 NaOH，與 1g 油脂進行鹼催化反應，反應溫度 55°C，反應時間為 10 小時或拉長至 24 小時。

3.8.2 直接酸催化轉酯反應

目的:以硫酸為催化劑分別進行，先萃取油脂並去除紅酵母菌菌粉，再進行轉酯化之兩步驟反應，與直接將紅酵母菌粉當作料源進行轉酯反應，比較有無去除菌粉對於 FAME 含量跟產率之影響。

I. 兩步驟先萃取油脂後去除菌粉再進行轉酯化反應：

1. 秤取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，使用量筒盛裝 60ml 之甲醇倒入血清瓶中。
2. 將血清瓶置於磁石攪拌機上進行油脂萃取，萃取時間為一個小時。
3. 萃取後之溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 添加 0.8ml H_2SO_4 至除去菌粉之含有菌油的甲醇溶液中進行轉酯化，反應時間為 1 小時、溫度 55°C。
5. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。
6. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

II. 直接酸轉酯化:

1. 秤取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，使用量筒盛裝 60ml 之甲醇倒入血清瓶中。
2. 再添加 0.8ml H_2SO_4 直接進行酸催化轉酯，反應時間為 1 小時、溫度 55 $^{\circ}\text{C}$ 。
3. 待其反應完成冷卻後，將溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。
5. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

3.8.2.1 探討催化劑添加體積、溫度、時間、甲醇量、含水量等參數對生質柴油產率的影響

A. 時間對於生質柴油產率的影響

1. 秤取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，使用量筒盛裝 60ml 之甲醇倒入血清瓶中，配置成菌重比甲醇量為 1:30。
2. 再添加 0.8ml H_2SO_4 直接進行酸催化轉酯，反應時間分別為 30 分鐘、1 小時、5 小時、10 小時以及 15 小時，反應溫度溫度為 55 $^{\circ}\text{C}$ 。
3. 待其反應完成冷卻後，將溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清

洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。

5. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

B. 溫度對於生質柴油產率的影響

1. 稱取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，使用量筒盛裝 60ml 之甲醇倒入血清瓶中，配置成菌重比甲醇量為 1:30。
2. 再添加 0.8ml H_2SO_4 直接進行酸催化轉酯，反應時間為 1 小時，反應溫度為 55°C、70°C 及 85°C。
3. 待其反應完成冷卻後，將溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。
5. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

C. 甲醇量對於生質柴油產率的影響

1. 稱取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，分別使用量筒盛裝 20、40、60、80、與 100ml 之甲醇倒入血清瓶中，配置成菌重比甲醇量為 1:10 到 1:50。
2. 再添加 0.8ml H_2SO_4 直接進行酸催化轉酯，反應時間為 1 小時、溫度 55°C。
3. 待其反應完成冷卻後，將溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清

洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。

5. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

D. 硫酸體積對於生質柴油產率的影響

由於考慮到不同發酵條件所收集之菌體脂質含量也有所不同，因此對於催化劑的探討是採用以作為料源之菌體內所含之總脂質量，以脂質之重量添加不同硫酸體積比(w/v)作為探討。

1. 秤取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，使用量筒盛裝 60ml 之甲醇倒入血清瓶中，配置成菌重比甲醇量為 1:30。
2. 再添加 0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1ml、1.2ml、1.4ml H_2SO_4 於 60ml 甲醇中，直接進行酸催化轉酯，反應時間為 1 小時，反應溫度為 $55^{\circ}C$ 。
3. 待其反應完成冷卻後，將溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。
5. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

E. 含水量對於生質柴油產率的影響(使用最佳條件進行轉酯)

1. 秤取 2g 乾燥菌粉並添加 2ml 去離子水於血清瓶裡，使用量筒盛裝 80ml 之甲醇倒入血清瓶中，配置成菌重比甲醇量為 1:40；另一則是直接使用濕菌稱取等重於 2g 乾燥菌粉之生物量於血清瓶裡，使用量筒盛裝 60ml 之甲醇倒入血清瓶中，配置成菌重比甲醇量為 1:40。

2. 再添加 1ml H_2SO_4 直接進行酸催化轉酯，反應時間為 1 小時，反應溫度溫度為 70°C 。
3. 待其反應完成冷卻後，將溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。
5. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

3.8.2.2 直接酸催化轉酯之最佳條件

1. 秤取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，使用量筒盛裝 80ml 之甲醇倒入血清瓶中，配置成菌重比甲醇量為 1:40。
2. 再添加 1ml H_2SO_4 直接進行酸催化轉酯，反應時間為 1 小時，反應溫度溫度為 70°C 。
3. 待其反應完成冷卻後，將溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。
5. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

3.8.3 微波酸催化轉酯反應

目的:以硫酸為催化劑分別進行，測試不同方式萃取油脂，再進行微波轉酯化反應對於生質柴油產率之影響。

I. 直接添加甲醇萃取油脂後，再進行微波轉酯化之兩步驟反應：

1. 秤取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，使用量筒盛裝 60ml 之甲醇倒入血清瓶中。
2. 將血清瓶置於磁石攪拌機上進行油脂萃取，萃取時間為一個小時。
3. 萃取後之溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 添加 0.8ml H_2SO_4 至除去菌粉之含有菌油的甲醇溶液中進行微波轉酯，微波功率為 100 瓦特，時間 5 分鐘。
5. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。
6. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

II. 利用微波進行萃取油之後，再進行微波轉酯化之兩步驟反應：

1. 秤取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，使用量筒盛裝 60ml 之甲醇倒入血清瓶中。
2. 將其進行微波萃取油脂，功率 100 瓦特，萃取時間 5 分鐘。
3. 萃取後之溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 添加 0.8ml H_2SO_4 至除去菌粉之含有菌油的甲醇溶液中進行轉酯化，反應時間為 1 小時、溫度 $55^{\circ}C$ 。
5. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。
6. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

III. 直接進行微波轉酯化:

1. 秤取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，使用量筒盛裝 60ml 之甲醇倒入血清瓶中。
2. 添加 0.8ml H_2SO_4 至除去菌粉之含有菌油的甲醇溶液中進行轉酯化，反應時間為 1 小時、溫度 $55^\circ C$ 。
3. 待其反應完成冷卻後，將溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。
5. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

3.8.3.1 探討催化劑添加體積、功率、時間、甲醇量、含水量等參數對生質柴油產率的影響

A. 微波功率對於生質柴油產率的影響

1. 秤取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，使用量筒盛裝 60ml 之甲醇倒入血清瓶中，配置成菌重比甲醇量為 1:30。
2. 再添加 0.8ml H_2SO_4 直接進行酸催化轉酯，微波功率分別為 100W、200W 以及 300W，時間為 5 分鐘。
3. 待其反應完成冷卻後，將溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清

洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。

5. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

B. 微波時間對於生質柴油產率的影響

1. 稱取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，使用量筒盛裝 60ml 之甲醇倒入血清瓶中，配置成菌重比甲醇量為 1:30。
2. 再添加 0.8ml H_2SO_4 直接進行酸催化轉酯，微波功率為 100W，時間分為 1、3、5、7、9 分鐘。
3. 待其反應完成冷卻後，將溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。
5. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

C. 甲醇量對於生質柴油產率的影響

1. 稱取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，分別使用量筒盛裝 20、40、60、80、與 100ml 之甲醇倒入血清瓶中，配置成菌重比甲醇量為 1:10 到 1:50。
2. 再添加 0.8ml H_2SO_4 直接進行酸催化轉酯，微波功率為 100W，時間 5 分鐘。
3. 待其反應完成冷卻後，將溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清

洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。

5. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

D. 硫酸體積對於生質柴油產率的影響

由於考慮到不同發酵條件所收集之菌體脂質含量也有所不同，因此對於催化劑的探討是採用以作為料源之菌體內所含之總脂質量，以脂質之重量添加不同硫酸體積比(w/v)作為探討。

1. 秤取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，使用量筒盛裝 60ml 之甲醇倒入血清瓶中，配置成菌重比甲醇量為 1:30。
2. 再添加 0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1ml、1.2ml、1.4ml H_2SO_4 於 60ml 甲醇中，直接進行酸催化轉酯，微波功率為 100W，時間 5 分鐘。
3. 待其反應完成冷卻後，將溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。
5. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

E. 含水量對於生質柴油產率的影響(使用最佳條件進行轉酯)

1. 秤取 2g 乾燥菌粉並添加 2ml 去離子水於血清瓶裡，使用量筒盛裝 80ml 之甲醇倒入血清瓶中，配置成菌重比甲醇量為 1:40；另一則是直接使用濕菌稱取等重於 2g 乾燥菌粉之生物量於血清瓶裡，使用量筒盛裝 60ml 之甲醇倒入血清瓶中，配置成菌重比甲醇量為 1:40。

2. 再添加 1ml H₂SO₄ 直接進行酸催化轉酯，微波功率為 100W，時間 5 分鐘。
3. 待其反應完成冷卻後，將溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。
5. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

3.8.3.2 微波轉酯化之最佳條件

1. 秤取 2g 乾燥菌粉於血清瓶裡，使用量筒盛裝 80ml 之甲醇倒入血清瓶中，配置成菌重比甲醇量為 1:40。
2. 再添加 1ml H₂SO₄ 直接進行酸催化轉酯，微波功率為 100W，時間為 5 分鐘。
3. 待其反應完成冷卻後，將溶液經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，去除菌粉。
4. 以減壓濃縮去除未反應甲醇，殘餘之生質柴油以正己烷回溶後再以水清洗。有機相以分液漏斗分離，以無水硫酸鈉除水。
5. 以 TLC 進行初步 FAME 追蹤及 GC 進行分析 FAME 含量。

3.9 實驗裝置圖

本實驗所使用的培養裝置，包括搖瓶、5 L 氣舉式發酵槽以及 100 L 氣舉式發酵槽。

3.9.1 搖瓶發酵培養裝置圖



圖 3-4 *Rhodotorula glutinis* 之搖瓶實驗裝置圖

3.9.2 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。

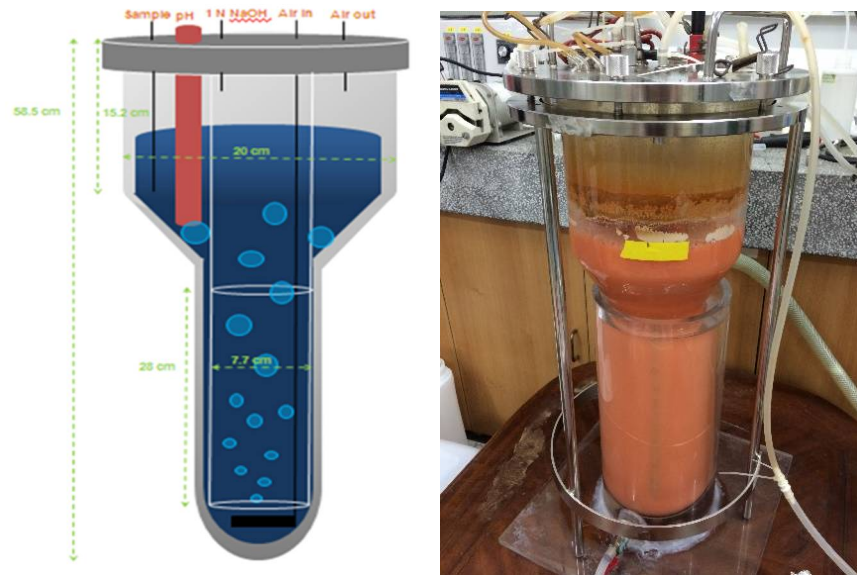


圖 3-5 5 L 氣舉式發酵槽裝置圖

3.9.3 100 L 氣舉式饋料發酵培養裝置圖

本實驗所使用 100 L 氣舉式發酵槽高度為 203.1 cm，外管直徑 32.0 cm，內管直徑 25.7 cm，上套管長 53.1 cm，下套管長 52.7 cm，套管直徑 8.5 cm，實際發酵體積為 80 L。



圖 3-6 100 L 氣舉式發酵槽裝置圖

3.9.4 直接轉酯化裝置圖

直接轉酯化使用三點式磁石加熱攪拌器，進行隔水加熱與攪拌，並用溫度計測量、控制溫度，控制其誤差範圍在正負 2°C。

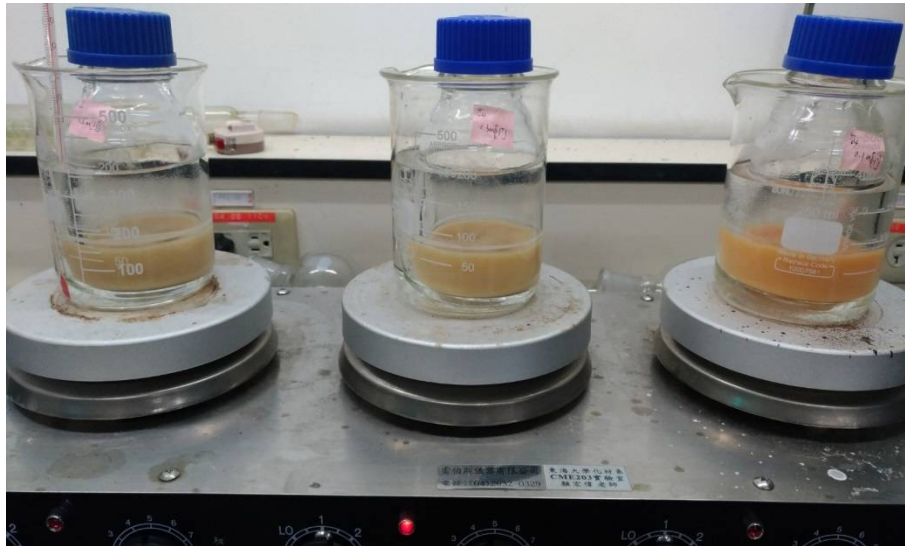


圖 3-7 隔水加熱進行直接酸催化轉酯

3.9.5 微波轉酯化裝置圖

本實驗使用東元家電 31L 微電腦微波爐，在上方外殼鑽洞進行改裝，使緩衝瓶能夠放入，連接冷凝管。

微波爐其外型尺寸(H x W x D)：304 x 515 x 375 mm，微波輸出最高功率為 10,00W。



圖 3-8 微波轉酯化裝置圖

第四章 結果與討論

4.1 氣舉式批次發酵程序

從搖瓶發酵放大培養至 5 L 以及 100L 氣舉式發酵槽內批次發酵，分別用粗甘油與葡萄糖作為碳源進行培養，收集其菌體進行油脂萃取與轉酯化實驗。

4.1.1 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序

前人以粗甘油為碳源，添加 1g/L Tween80 與 2.5% 的不同油品實驗，發現添加的油品以棕梛油效果最佳(蘇國智., 2016)，因此本實驗將另外添加之 2.5% 油品改成廢棄食用油，其實驗結果如圖 4-1，培養至 192 小時之最大的菌體濃度約可達到 38.2 g/L，而最大油脂含量 (lipid content) 大約為 66%，因此最大油脂累積濃度為 25.21 g/L，其最大油脂含量 (lipid content) 相差不大，但最大的菌體濃度有明顯的提升，效果優異，因此可得到更多的脂質，提供萃取與轉酯化實驗，結果如表 4-1。

推測以廢棄食用油培養效果能使菌體濃度提升的原因，乃是其含有油炸過動、植物食物所殘留之微量元素，有利於黏紅酵母菌的生長。

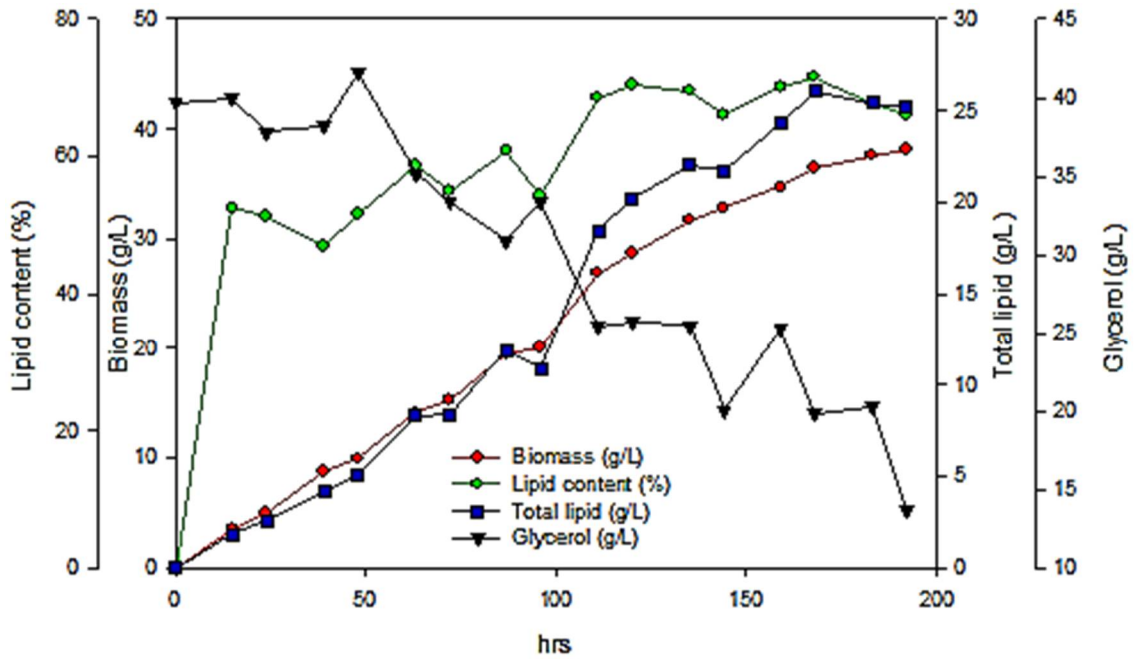


圖 4-1 添加 2.5 % 廢棄食用油與 1 g/L Tween80 培養之 5L 氣舉式發酵槽

表 4-1 5 L 氣舉式發酵槽添加 2.5 %廢棄食用油之動力學參數變化

	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/hr)	Max. lipid content (%, w/w)	Glycerol consumption rate (g/L/hr)	Max. lipid productivity (g/L/hr)
2.5% palm oil	24.5	0.127	55.12	0.19	0.07
2.5% recycle oil	38.2	0.199	66.00	0.14	0.13

4.1.2 100L 氣舉式發酵槽饋料批次發酵程序

為了能將 *Rhodotorula glutinis* 的發酵程序應用於工業上，並且增加其生長速率，於是利用 100 L 氣舉式發酵槽進行培養，探討其對 *Rhodotorula glutinis* 生長的影響性。碳源以 60 g/L 之葡萄糖進行培養，實驗結果如圖 4-2，培養至 87 小時之最大的菌體濃度約可達到 21.8 g/L，而最大油脂含量 (lipid content) 大約為 45%，因此最大油脂累積濃度為 9.81 g/L。

此發酵槽培養過程，在 24 小時時再饋了 2.4Kg 的葡萄糖，但是由於外接式 pH 計發生故障，只能手動饋入 NaOH 控制 pH 值，導致紅酵母菌生長情況不太理想，但此發酵槽目的是為了收集菌體進行後續的萃取油脂與轉酯化的實驗，因此還是能收集到大量菌體提供後續的實驗。

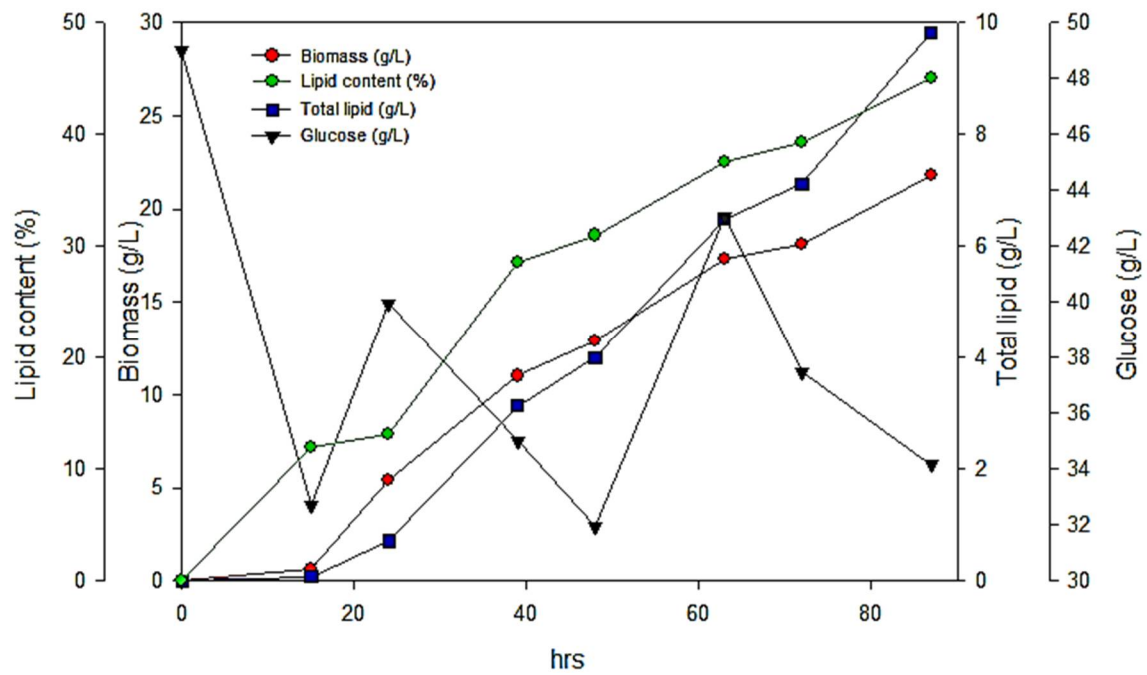


圖 4-2 以葡萄糖為碳源進行培養之 100L 氣舉式發酵槽

表 4-2 100 L 氣舉式發酵槽之動力學參數變化

	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/hr)	Max. lipid content (%, w/w)	Glucose consumption rate (g/L/hr)	Max. lipid productivity (g/L/hr)
60g/L glucose	21.8	0.251	45.06	0.151	0.11

4.2 不同油脂萃取方式

對於SCO之萃取有許多不同的方式，如何能使用最佳的方式進行萃取油脂，並且能減少有機溶劑的使用與省略將菌體乾燥後再進行破壁等，能有效的降低能源的消耗，因此本實驗使用黏紅酵母進行不同油脂萃取的探討。

此油脂萃取實驗分成機械性質之超高壓破壁萃取(委託金屬工業研發中心進行)與超音波破碎以及非機械性質之利用有機溶劑混合攪拌進行直接萃取。

4.2.1 超高壓破壁萃取油脂

由本實驗室提供金屬工業研發中心紅酵母菌發酵液，進行低溫高速離心(10000rpm、4°C、15min)，濃縮成酵母菌泥(含水量約 70~75%)，冷藏(4°C)備用。其萃取液使用正己烷/甲醇體積比 2:1 萃取凍乾菌體之含油率約 55%，如圖 4-3 所示。

採用金屬中心建置之超高壓水處理設備，測試條件：壓力 200~400MPa、常溫、時間 5~30min，升降壓次數 1~6 次、添加離子水(電解水)體積倍率 1~3 調整菌液濃度，進行濕菌細胞破壁，實驗結果如表 4-3。

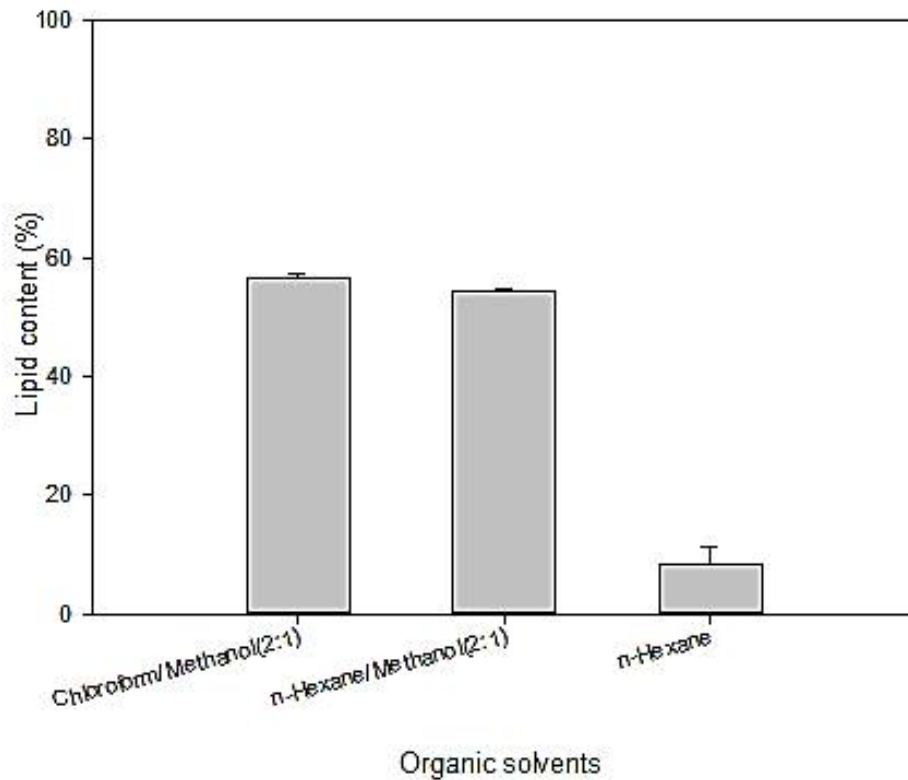


圖 4-3 不同萃取溶劑系統及油脂萃取率比較

表 4-3 金屬工業研發中心超高壓破壁萃取油脂

實驗組	濕菌	添加液	超高壓	持壓時間	升降壓次數	萃取率
Exp 1	30g	離子水 30ml	400MPa	30min	1	95.60%
Exp 2	30g	離子水 90ml	400MPa	30min	1	81.38%
Exp 3	30g	去離子水 90ml	400MPa	30min	1	78.40%
Exp 4	30g	離子水 30ml	400MPa	5min	6	100.8%
Exp 5	30g	離子水 30ml	300MPa	5min	6	92.80%
Exp 6	30g	離子水 30ml	200MPa	5min	6	88.19%
Exp 7	30g	離子水 30ml	400MPa	10min	3	99.88%
C1_OB	30g	離子水 30ml	-	-	-	89.96%
C2_OD	30g	去離子水 30ml	-	-	-	91.66%

萃取物油脂原為液態，以減壓濃縮移除正己烷，無法完全移除正己烷，室溫一段時間後油脂凝固，如圖 4-4 所示。



圖 4-4 萃取油脂後固化

4.2.1.1 添加液對於萃取率之影響

如表 4-3，對照 Exp 1 和 Exp 2 之實驗結果，在相同的超高壓、持壓時間、升降壓次數的條件下，改變添加液量，其萃取率隨添加液量增加而降低。然而，添加液量越多破壁後浮出之白色油脂越多，但萃油率並未隨之反映。推測含水量會對油脂萃取率造成一定的影響。

4.2.1.2 壓力對於萃取率之影響

如表 4-3，對照 Exp 4、Exp 5 和 Exp 6 之實驗結果，在相同的添加液量、持壓時間、升降壓次數的條件下，改變超高壓，其萃取率隨壓力增加而增加。推測超高壓使紅酵母之細胞壁破壁的更加徹底，使胞內的油脂更易被萃取出來。

4.2.1.3 升降壓次數對於萃取率之影響

如表 4-3，對照 Exp 1、Exp 4 和 Exp 7 之實驗結果，在相同的添加液量、超高壓、持壓時間的條件下，改變升降壓次數，萃取率隨升降壓次數增加而增加。推測升降壓次數的增加能使紅酵母之細胞壁更加多次的被破碎，使胞內的油脂更易被萃取出來。

4.2.1.4 添加離子水作為添加液對於萃取率之影響

如表 4-3，對照 Exp 2 和 Exp 3 之實驗結果，在相同的添加液量、超高壓、持壓時間、升降壓次數的條件下，比較分別添加離子水和去離子作為添加液，添加離子水作為添加液有助於提高超高壓破壁之萃取率。但常壓時，有無添加液並無明顯影響。推測離子水和普通水相比其滲透壓（強弱）、分子團（大小）、溶解度（大小）電導率（高低）、pH 值（大小）、表面張力、密度、熱導率、含氧量等都不盡相同。諸多可能原因造成萃取率明顯高於添加去離子水作為添加液。

4.2.1.5 不經超高壓破壁對照組

如表 4-3，以 C1_OB 和 C1_OD 為不經超高壓破壁之實驗結果，從結果發現，萃取劑為正己烷/甲醇時，雖可提高萃油效率，但缺乏選擇性，加上甲醇分子易穿透出入細胞，因此從對照組(未破壁處理)也能萃取出大量油脂。

4.2.2 超音波破碎萃取油脂

4.2.2.1 不同有機溶劑之萃取效果

實驗使用氯仿/甲醇(2:1)、正己烷/甲醇(2:1)、正己烷/甲醇(1:1)、氯仿、甲醇、乙醇作為萃取油脂之有機溶劑，萃取結果如圖 4-5 所示。

由圖 4-5、表 4-4 得知，以氯仿/甲醇(2:1)作為溶劑所萃取之油脂為對照組，計算其他有機溶劑所萃取出之油脂回收率，實驗結果以甲醇的效果為最佳，油脂回收率可達 114.22%，而氯仿/甲醇(2:1)、正己烷/甲醇(2:1)、正己烷/甲醇(1:1)等萃取液也能萃取出大量油脂，相較之下，使用正己烷與乙醇之萃取效果明顯不佳，推測原因乃甲醇分子易穿透出入細胞，因此有添加甲醇之混合溶劑便能達到萃取油脂的效果。而氯仿則是因其比重比菌粉大，菌粉都懸浮在溶液上層，故無法離心將溶劑與菌粉分離，故萃取油脂是失敗的。

因此後續實驗將使用甲醇為萃取溶劑，進行油脂的萃取。

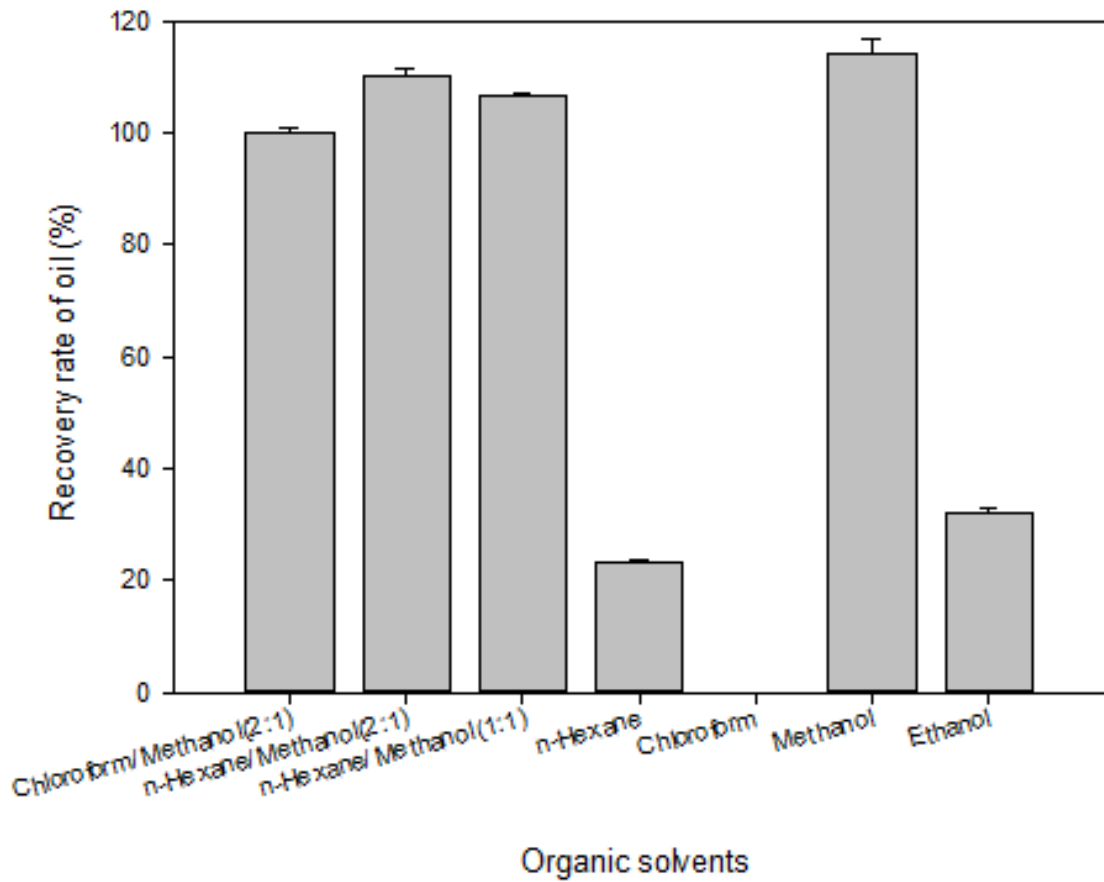


圖 4-5 不同有機溶劑萃取油脂之回收率

表 4-4 不同甲醇量經超音波破壁與直接萃取油脂回收率之比較

萃取液(5ml) 油脂回收率 (%)	氯仿/甲醇 (2:1)	正己烷/甲 醇(2:1)	正己烷/甲 醇(1:1)	正己烷	甲醇	乙醇
超音波輔助	100.00±0.99	110.33±1.15	106.59±0.32	23.31±0.19	114.22±2.66	32.28±0.64

4.2.2.2 添加不同甲醇量對於萃取率之影響

上述實驗得知使用甲醇作為溶劑便能萃取出大量油脂，便進一步探討添加的甲醇量，以 50mg 之乾燥菌體重與添加甲醇量(w/v)，如圖 4-6、表 4-5 所示。

以添加甲醇量 5ml 所萃取出之油脂作為對照組，發現其油脂回收率隨甲醇添加量增加而增加，以添加 1ml 之甲醇量對照 5ml 之甲醇量，其油脂回收效果差異十分顯著，但添加的甲醇量約在 4ml 便與 10ml 之回收率相差不大，因此 50mg 之乾燥菌體，使用 4ml 之甲醇量便能萃取出乾燥菌體內大量油脂，可減少有機溶劑的使用量，便能獲得最佳萃取效果。

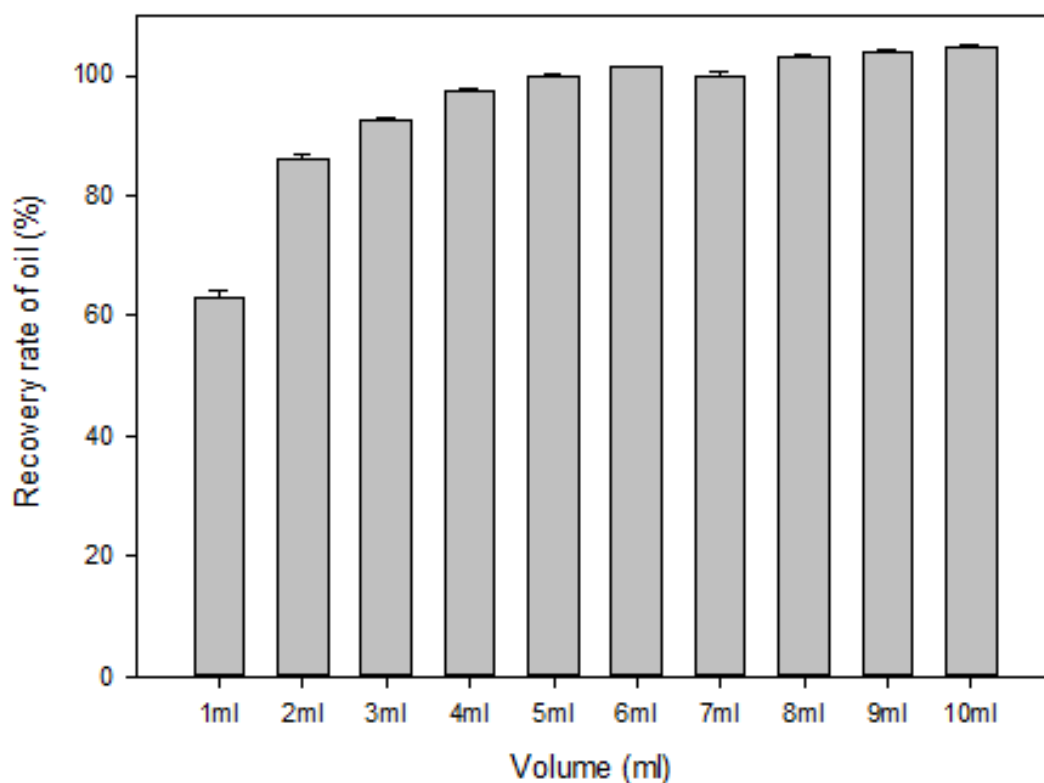


圖 4-6 經超音波破壁添加不同甲醇量萃取油脂之回收率

表 4-5 經超音波破壁添加不同甲醇量萃取油脂回收率之數據

50mg 菌重添加不同甲醇量 (ml)	油脂回收率 (%)
1	62.87±1.31
2	85.95±0.88
3	92.41±0.44
4	97.31±0.29
5	100.00±0.34
6	101.23±0.31
7	99.83±0.88
8	103.08±0.42
9	103.87±0.17
10	104.84±0.12

4.2.2.3 不同含水量對於萃取率之影響

本實驗以乾燥菌體添加去離子水，測試含水量對於油之萃取的影響，以便日後可以直接使用濕菌進行萃取油脂。

以 5ml 甲醇不添加去離子水作為對照組，實驗結果如圖 4-7、表 4-6 所示，50mg 之乾燥菌隨著添加的液體越多，油脂回收率有下降的趨勢，但與對照組相比差異不大，推測乃是因為萃取液甲醇溶劑極易與水互溶，是一個良好的吸水溶劑，因此能容忍一定的含水量而不影響油脂的萃取。

初步實驗推測使用濕菌萃取油脂其含水量在一定範圍之內並不會造成影響，因此便能簡化油脂萃取的前處理，節省能源上的消耗。

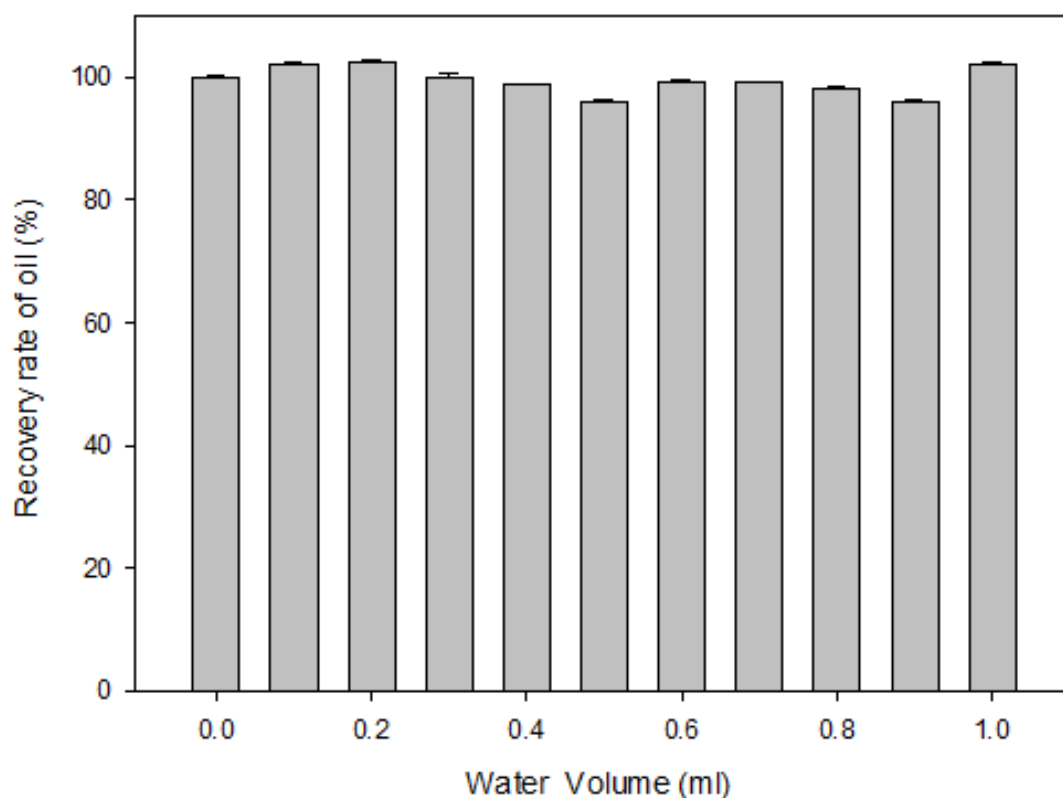


圖 4-7 經超音波破壁添加不同水量萃取油脂之回收率

表 4-6 經超音波破壁添加不同水量萃取油脂回收率之數據

50mg 菌重添加不同水量 (ml)	油脂回收率 (%)
0	100.00±0.30
0.1	101.94±0.32
0.2	102.29±0.61
0.3	99.93±0.87
0.4	98.88±0.10
0.5	96.03±0.26
0.6	99.34±0.19
0.7	99.09±0.27
0.8	98.17±0.41
0.9	95.96±0.29
1.0	102.14±0.43

4.2.3 不破細胞直接萃取油脂

對於 SCO 之萃取常以超音波輔助破碎細胞壁使脂質釋出，釋出之脂質再以有機溶劑進行萃取。以金屬中心測試不經超高壓破壁之對照組，因甲醇分子易穿透出入細胞，因此從也能萃取出大量油脂。

本實驗將以甲醇作為萃取液，不經破碎細胞壁直接進行萃取油脂的動作，測試添加的甲醇量、含水量與萃取時間進行探討。

4.2.3.1 添加不同甲醇量對於萃取率之影響

實驗結果如圖 4-8、表 4-7 所示，以添加 5ml 之甲醇量作為對照組，其油脂回收率隨添加甲醇量增加而上升，但添加 4ml 與添加 5ml 之甲醇量進行萃取之結果差異不大，因此 50mg 之乾燥菌體，使用 4ml 之甲醇量便能萃取出乾燥菌體內大量油脂，可減少有機溶劑的使用量，便能獲得最佳萃取效果。

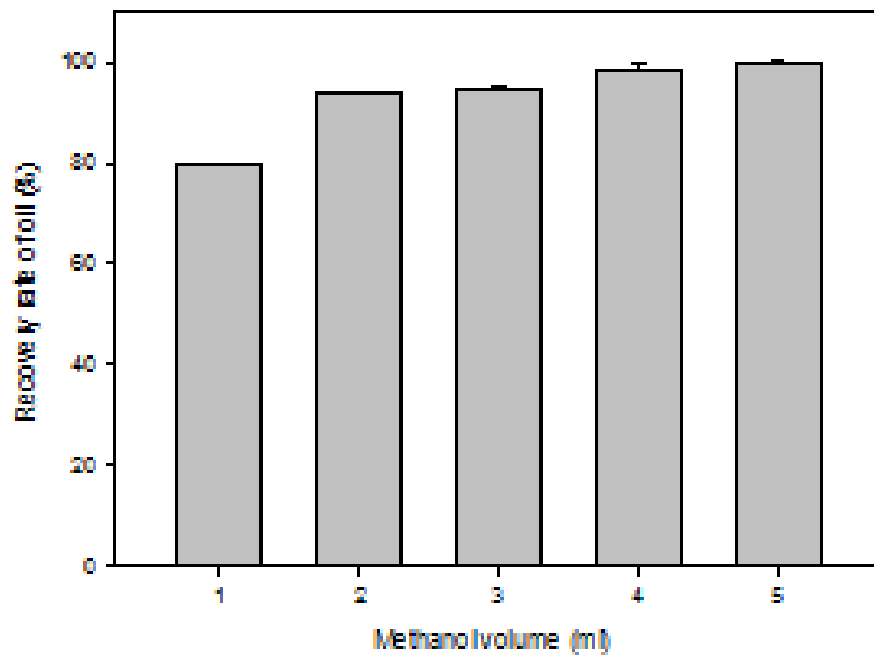


圖 4-8 不經破壁添加不同甲醇量直接萃取油脂之回收率

表 4-7 不破壁添加不同甲醇量直接萃取油脂回收率之數據

50mg 菌重添不同甲醇量 (ml)	油脂回收率 (%)
1	79.41±0.07
2	93.62±0.30
3	94.77±0.19
4	98.59±0.84
5	100.00±0.34

4.2.3.2 不同含水量對於萃取率之影響

實驗結果如圖 4-9、表 4-8 所示，以 5ml 甲醇不添加去離子水作為對照組，50mg 之乾燥菌隨著添加的液體越多，但油脂回收率變化似乎與對照組相比差異不大，推測乃是因為萃取液甲醇溶劑極易與水互溶，是一個良好的吸水溶劑，因此能容忍一定的含水量而不影響油脂的萃取。

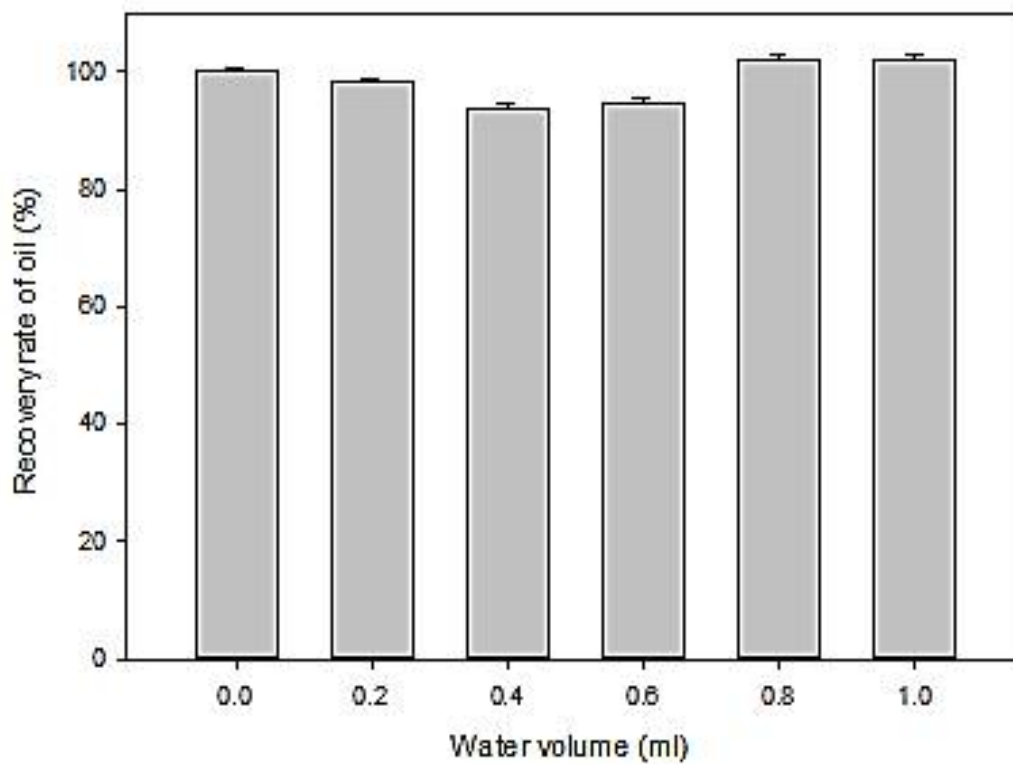


圖 4-9 不經破壁添加不同水量直接萃取油脂之回收率

表 4-8 不破壁添加不同水量直接萃取油脂回收率之數據

50mg 菌重添不同水量 (ml)	油脂回收率 (%)
0	100.00±0.35
0.2	98.28±0.33
0.4	94.59±0.53
0.6	94.59±0.83
0.8	101.72±1.04
1.0	102.16±0.56

4.2.3.3 不同萃取時間對於萃取率之影響

實驗結果如圖 4-10、表 4-9 所示，以萃取時間一小時作為對照組，發現縮短或是拉長萃取時間對於萃取油脂並無顯著影響，推測乃因甲醇分子易穿透出入細胞，因此不需花費到一小時的時間便能萃取出大量油脂，可節省萃取所需時間，提升效率。

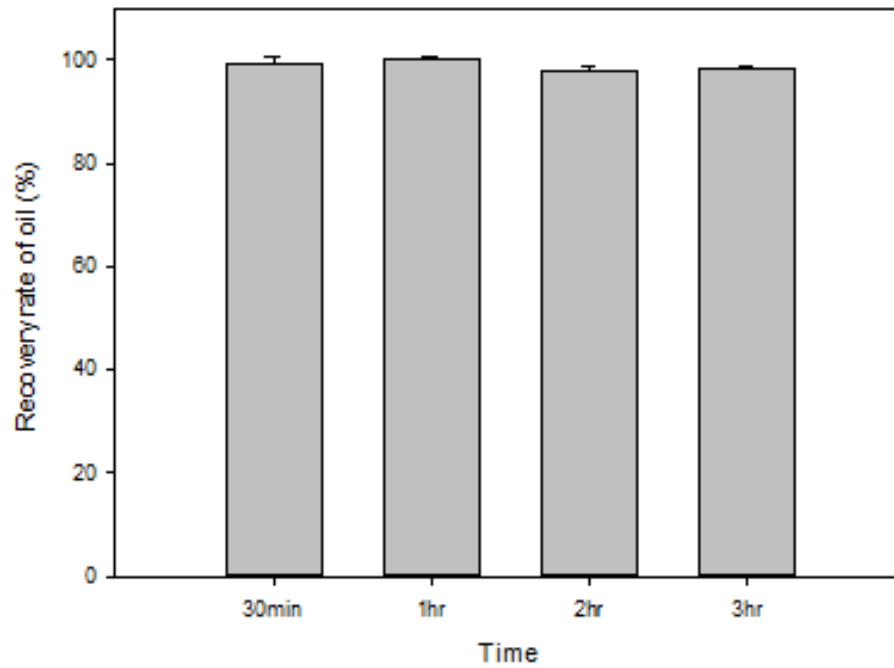


圖 4-10 不破壁直接萃取之不同萃取時間油脂回收率

表 4-9 不破壁直接萃取之不同萃取時間油脂回收率之數據

萃取時間	油脂回收率 (%)
30min	99.32±1.30
1hr	100.00±0.43
2hr	97.62±0.99
3hr	98.12±0.54

4.3 不同油脂萃取方式之綜合討論

將前述之(1)金屬中心超高壓破壁萃取、(2)超音波輔助破壁萃取、(3)不經破壁直接萃取油脂，這三大部分作為油脂萃取的探討。

以嘗試新穎技術超高壓破壁前處理技術，結果發現不經超高壓破壁之實驗結果，因甲醇分子缺乏選擇性，易穿透出入細胞，因此未破壁處理也能萃取出大量油脂。

而使用甲醇作為萃取液，比較經超音波破壁萃取與不經破壁直接添加萃取液萃取之實驗，其比較結果如表 4-10 所示，直接萃取油脂與使用超音波輔助進行破碎細胞壁，再以甲醇溶劑萃取油脂之結果，其油脂回收率都隨添加甲醇量增加而上升。而甲醇溶劑的使用上，使用 4ml 之甲醇量便能萃取出乾燥菌體內大量油脂，比較使用 5ml 甲醇量之對照組，其油脂回收率相差甚小，因此可減少有機溶劑的使用量，便能獲得不錯的萃取效果。

表 4-10 不同甲醇量經超音波破壁與直接萃取油脂回收率之比較

添加甲醇量(ml) 油脂回收率 (%)	1	2	3	4	5
超音波輔助	62.87±1.32	85.96±0.88	92.41±0.44	97.31±0.29	100±0.34
直接萃取	79.41±0.08	93.62±0.30	94.77±0.19	98.59±0.84	100±0.35

而添加不同水量，經超音波破壁萃取與不經破壁直接添加萃取液萃取之實驗，比較結果如表 4-11 所示，直接萃取油脂與使用超音波輔助進行破碎細胞壁，再以甲醇溶劑萃取油脂之結果，發現添加水量對於油脂萃取並無顯著的影響，推測乃因萃取液甲醇極易與水互溶，是一個良好的吸水溶劑，因此能容忍一定的含水量而不影響油脂的萃取，因此在一定的含水範圍內，不經破碎細胞壁萃取油脂之方式是可行的。相信對於使用濕菌進行直接萃取油脂是一大幫助，不僅省去繁雜的離心洗菌、凍乾菌體之前處理，也大大節省了能源的損耗。

表 4-11 不同含水量經超音波破壁與直接萃取油脂回收率之比較

添加水量(ml) 油脂回收率 (%)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
超音波輔助	100.00±0.30	102.29±0.61	98.88±0.10	99.34±0.19	98.17±0.41	102.14±0.43
直接萃取	100.00±0.35	98.28±0.34	93.83±0.54	94.59±0.83	101.72±1.04	102.16±0.56

4.4 鹼催化轉酯反應

SCO 通常被認為含有較多之游離脂肪酸，但文獻中的游離脂肪酸含量卻十分有限(Thliveros, P et al.,2014)。因此本實驗係以金屬工業研發中心經不同超高壓處理樣品進行鹼催化轉酯測試，結果如表 4-12 所示。經 GC 分析結果顯示脂肪酸甲酯量皆不高，推測原因可能是因為鹼催化效果受油品游離脂肪酸、水分含量抑制影響。

根據 Liu 及 Zhao 曾比較酸及鹼對 *Lipomyces starkeyi* 進行直接轉酯化。於 70 °C 下以鹼催化，反應十分緩慢且 FAME 產率低於 20%。作者懷疑於無水狀態下酵母菌細胞壁不易分解，但添加水分後又產生皂化現象，因此放棄鹼催化改採酸催化(Liu, B et al.,2007)。

實驗結果如圖 4-11，產生皂化反應，因此本實驗放棄使用鹼催化進行轉酯化，改採用硫酸作為催化劑進行酸催化轉酯化。



圖 4-11 鹼催化轉酯皂化現象

表 4-12 不同超高壓處理樣品 FAME 分析結果

編號	轉酯條件	FAME
1	含 2g/L NaOH 的甲醇 3ml+甲醇 7ml，共 10ml 甲醇 含 0.006gNaOH，溫度 55°C 反應 10 小時。	11.36%
2	含 2g/L NaOH 的甲醇 4ml+甲醇 6ml，共 10ml 甲醇 含 0.008gNaOH，溫度 55°C 反應 10 小時。	12.60%
3	含 2g/L NaOH 的甲醇 4ml+甲醇 6ml，共 10ml 甲醇 含 0.008gNaOH，溫度 55°C 反應 10 小時。	10.82%
4	含 2g/L NaOH 的甲醇 5ml+甲醇 5ml，共 10ml 甲醇 含 0.01gNaOH，溫度 55°C 反應 10 小時。	13.74%
5	含 2g/L NaOH 的甲醇 5ml+甲醇 5ml，共 10ml 甲醇 含 0.01gNaOH，溫度 55°C 反應 24 小時。	17.06%
6	含 2g/L NaOH 的甲醇 5ml+甲醇 5ml，共 10ml 甲醇 含 0.01gNaOH，溫度 55°C 反應 24 小時。	15.58%
7	含 2g/L NaOH 的甲醇 1ml+甲醇 9ml，共 10ml 甲醇 含 0.002gNaOH，溫度 55°C 反應 10 小時。	14.77%
OB	含 2g/L NaOH 的甲醇 2ml+甲醇 8ml，共 10ml 甲醇 含 0.004gNaOH，溫度 55°C 反應 10 小時。	10.93%
OD	含 2g/L NaOH 的甲醇 2ml+甲醇 8ml，共 10ml 甲醇 含 0.004gNaOH，溫度 55°C 反應 10 小時。	15.32%

4.5 直接酸催化轉酯化

本實驗使用 100L 氣舉式發酵槽所收集之菌體來探討直接酸催化轉酯反應，其單位菌體萃取所含之總脂質如圖 4-12 所示。其菌體脂質含量為 49.27%。

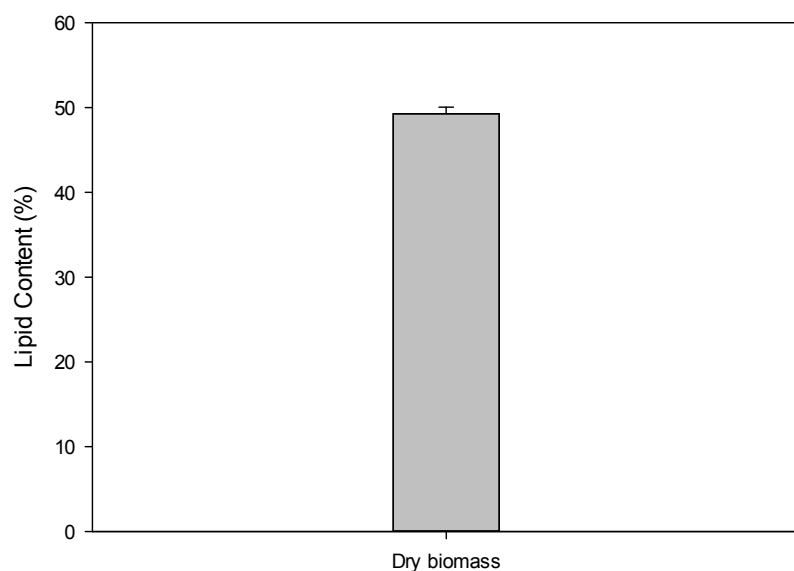
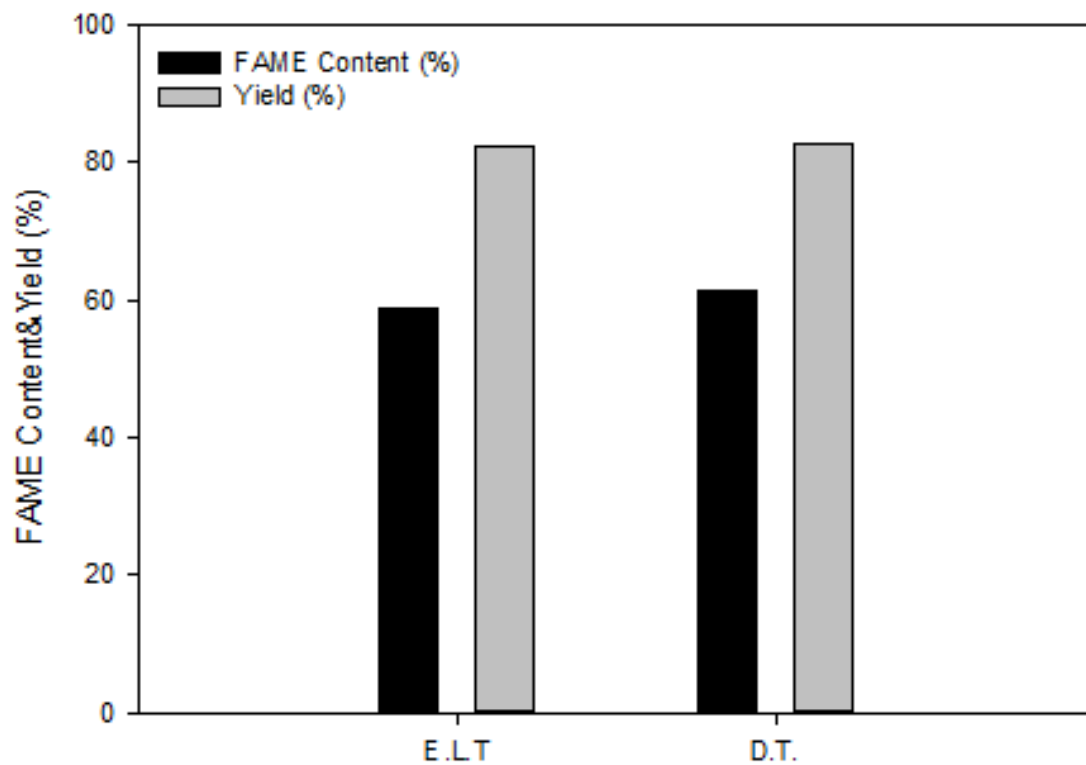


圖 4-12 100L 氣舉式發酵槽菌體之脂質含量

實驗以硫酸作為催化劑分別比較兩步驟轉酯化反應與直接酸催化轉酯反應，對於 FAME 含量跟生質柴油產率之影響，實驗結果如圖 4-13、表 4-13 所示。

由圖可看出先萃取油脂後去除紅酵母菌菌粉，再進行轉酯化之兩步驟反應，另一則是直接將紅酵母菌粉當作料源進行轉酯反應，其 FAME 含量跟產率之數值無明顯差異，應證 Thliveros 等人使用鹼催化進行直接轉酯化方法較傳統方法為簡單、省時，有其可行性相符，因此後續將使用硫酸作為催化劑探討催化劑濃度、溫度、時間、甲醇量等參數對生質柴油產率的影響。



E.L.T:先萃取油脂後去除紅酵母菌菌粉，再進行轉酯化之兩步驟反應

D.T :直接酸催化轉酯反應

圖 4-13 比較兩步驟轉酯化與直接轉酯化之生質柴油產率

表 4-13 兩步驟轉酯化與直接轉酯化之數據

	FAME Content (%)	Yield (%)
E.L.T	58.80	82.28
D.T	61.26	82.57

4.5.1 不同反應時間對於生質柴油產率的影響

本實驗固定甲醇添加量、酸濃度與反應溫度，探討不同轉酯化反應時間的影響，結果如圖 4-14、表 4-14 所示。其 FAME 含量隨著反應時間拉長有稍稍下降的趨勢，而反應 10 小時的產率可達到 96.46%，但時間拉長至 15 小時時產率卻降至 72.02%，根據文獻所示，主要原因乃是反應物中所加入的硫酸，隨反應時間拉長引起游離脂肪酸的降解(Carvalho,A.P. et al.,2005)。

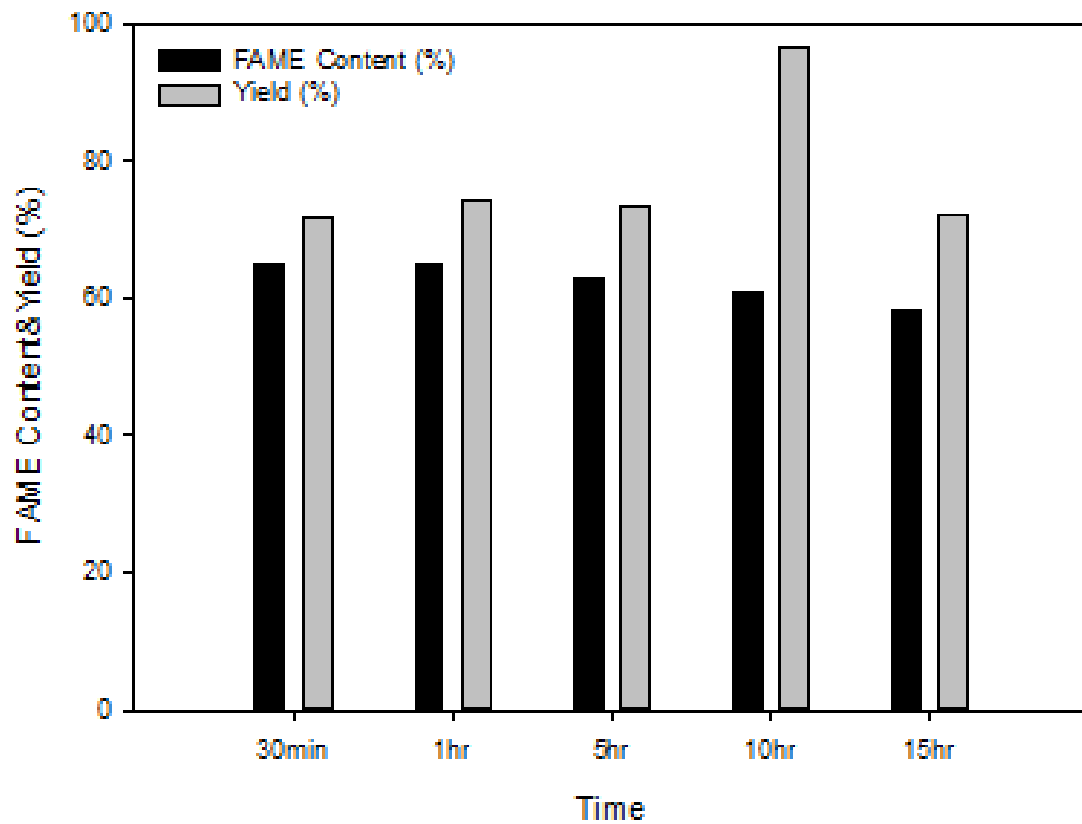


圖 4-14 不同反應時間之生質柴油產率

表 4-14 不同反應時間之數據

Time	FAME Content (%)	Yield (%)
30min	64.89	71.52
1hr	64.92	74.05
5hr	63.02	73.43
10hr	60.61	96.46
15hr	58.43	72.02

4.5.2 不同反應溫度對於生質柴油產率的影響

實驗結果如圖 4-15、表 4-15 所示，當溫度從 55°C 上升至 70°C 時，產率也從 85.05% 隨之上升至 96.38%，但溫度再往上升至 85°C 時，產率則稍微下降至 95.28%，其原因根據 Eevera 等人指出，當反應溫度升高到超過最佳溫度時，生物柴油的產率將會減少，因為當反應溫度較高時，會加速皂化反應，同時消掉耗催化劑(Eevera, T et al.,2009)。

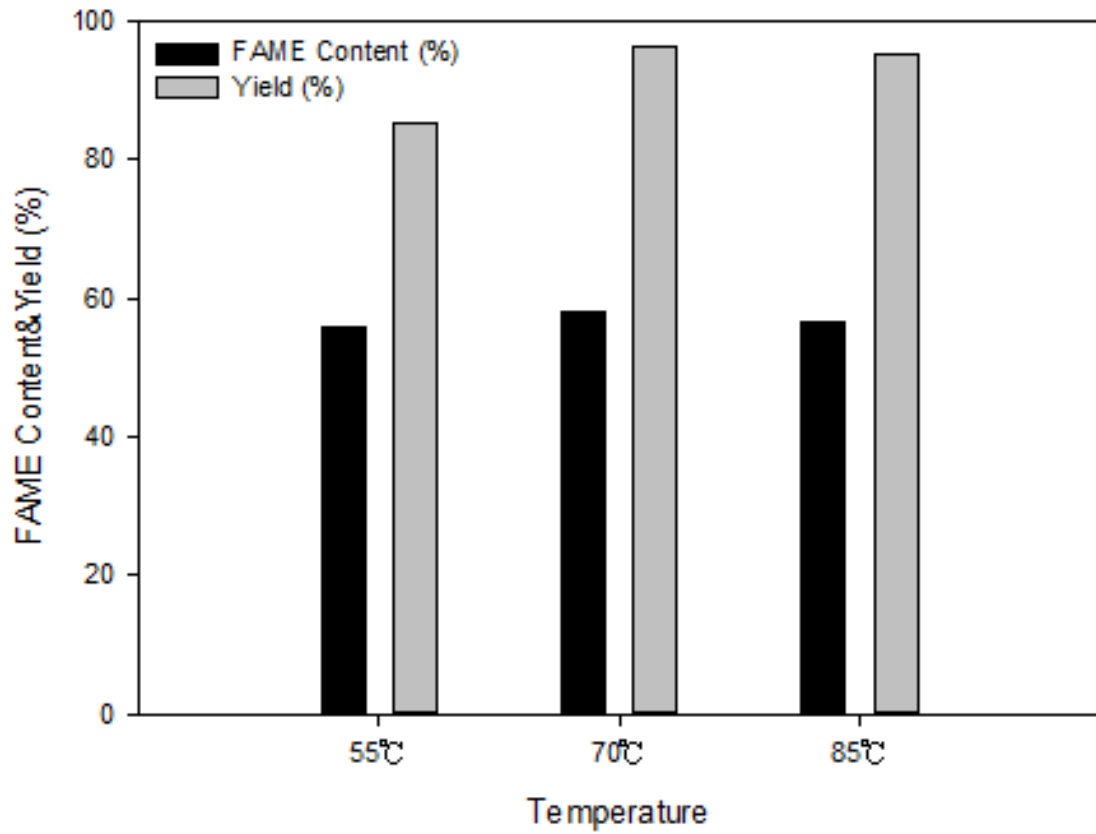


圖 4-15 不同溫度之生質柴油產率

表 4-15 不同溫度之數據

Temperature	FAME Content (%)	Yield (%)
55°C	55.69	85.05
70°C	57.87	96.38
85°C	56.52	95.28

4.5.3 不同甲醇比例對於生質柴油產率的影響

如圖 4-16 所示、表 4-16，實驗結果以菌重與甲醇的比例 1:40 為最佳產率，可達 81.85%，然而當比例增加至 1:50，產率反而下降至 78.46%，其原因根據 Alamu 等人的研究成果，觀察到生質柴油產量隨著油醇比例的增加而增加，但上限僅能增加至閾限值，乃是因為酯交換反應為一個化學平衡反應，其油醇的質量比對於產量的影響是雙向的(Alamu et al.,2007)。

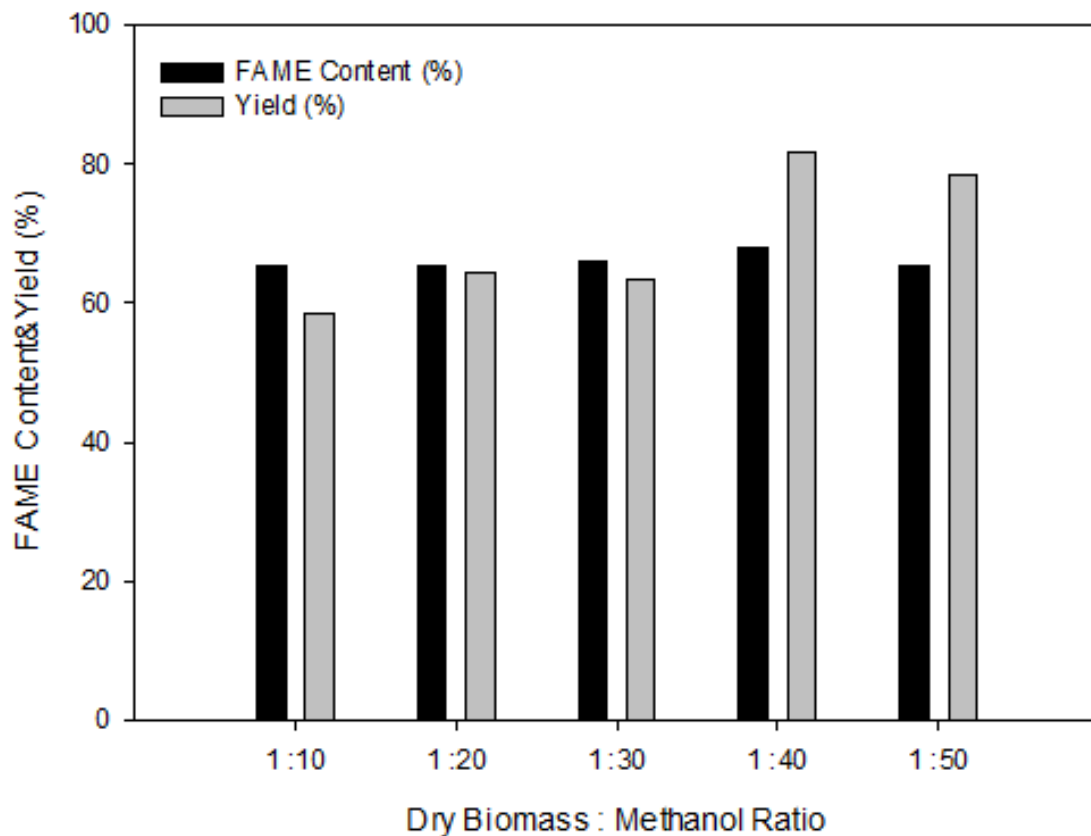


圖 4-16 不同甲醇比例之生質柴油產率

表 4-16 不同甲醇比例之數據

Biomass/Methanol(w/v)	FAME Content (%)	Yield (%)
1:10	65.33	58.48
1:20	65.48	64.53
1:30	66.18	63.40
1:40	67.88	81.85
1:50	65.50	78.46

4.5.4 不同催化劑含量對於生質柴油產率的影響

本實驗係以脂質之重量添加不同硫酸體積比(w/v)作為探討，實驗結果如圖 4-17、表 4-17 所示，當添加催化劑含量升高時，其生質柴油產率也隨之上升。本實驗作為料源之菌體稱取 2 克重，內含脂質重量為 1 克重(lipid content 約 50%)，當硫酸添加至 1ml 時，脂質重比硫酸體積(w/v)為 1:1，其產率可達到 80.64%。

推測其原因乃根據 Mondala 等人的實驗結果，當催化劑濃度低時，反應速率相對較慢，增加催化劑的濃度能使 FAME 的產率增加 (Mondala et al.,2009)。但催化劑濃度進一步增加時會導致產量略有下降，其原因根據 Takisawa 等人的實驗得知，過量的硫酸會降解游離脂肪酸(Takisawa et al., 2013)；此外，過量的硫酸也可促進聚合含有雙鍵的不飽和脂肪酸 (Erhan et al.,1994)，這兩種因素皆會降低生質柴油產量。

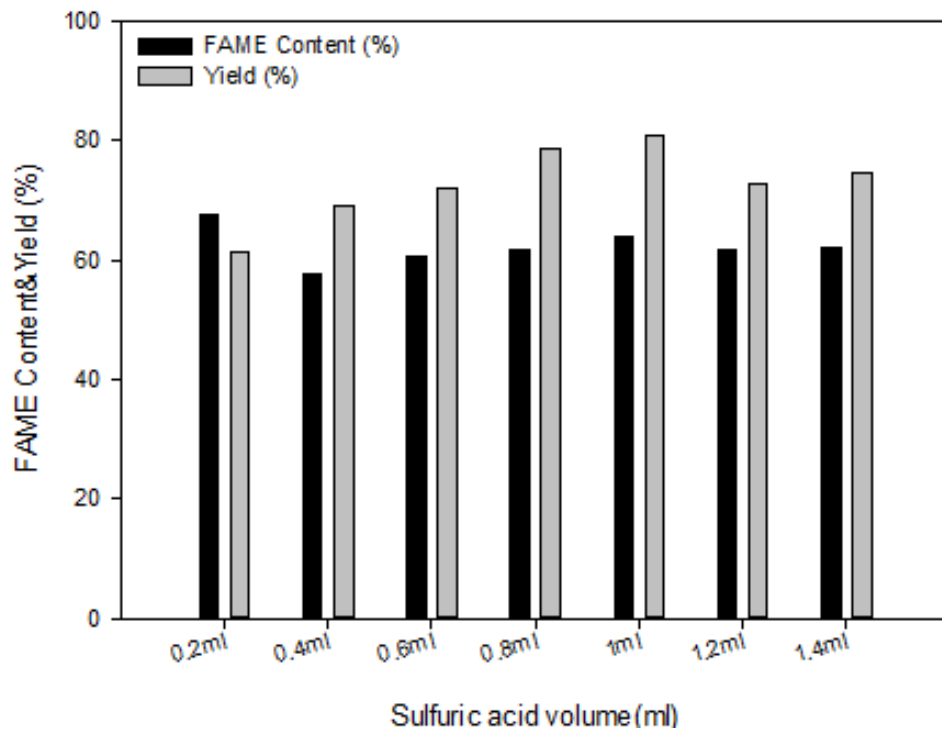


圖 4-17 不同催化劑含量之生質柴油產率

表 4-17 不同催化劑含量之數據

1g lipid add	FAME Content (%)	FAME Yield (%)
H ₂ SO ₄ volume (ml)		
0.2	67.55	61.17
0.4	57.78	68.98
0.6	60.71	72.14
0.8	61.58	78.51
1.0	63.81	80.64
1.2	61.74	72.55
1.4	62.11	74.47

4.5.5 直接酸催化轉酯之最適條件

關於最適條件以2g乾燥菌體、甲醇80ml添加1ml之 H_2SO_4 (濃度為0.235M)，反應溫度為 70°C ，比較反應時間為1小時與10小時之產率，實驗結果如圖4-18、表4-18所示，產率分別為91.18%與92.14%。

實驗結果雖然是以反應時間為10小時之產率較高，但與反應時間為1小時之產率差異甚小，且考量到拉長反應時間追求高產率將不符經濟成本並無意義，因此本實驗綜合上述溫度、時間、甲醇量與催化劑濃度等參數，最佳條件以2g乾燥菌體、甲醇80ml添加1ml之 H_2SO_4 (濃度為0.235M)，反應溫度為 70°C 、時間為1hr，進行五重複，所得之結果如圖4-19、表4-19所示，其FAME含量為70.88%，產率為77.64%。

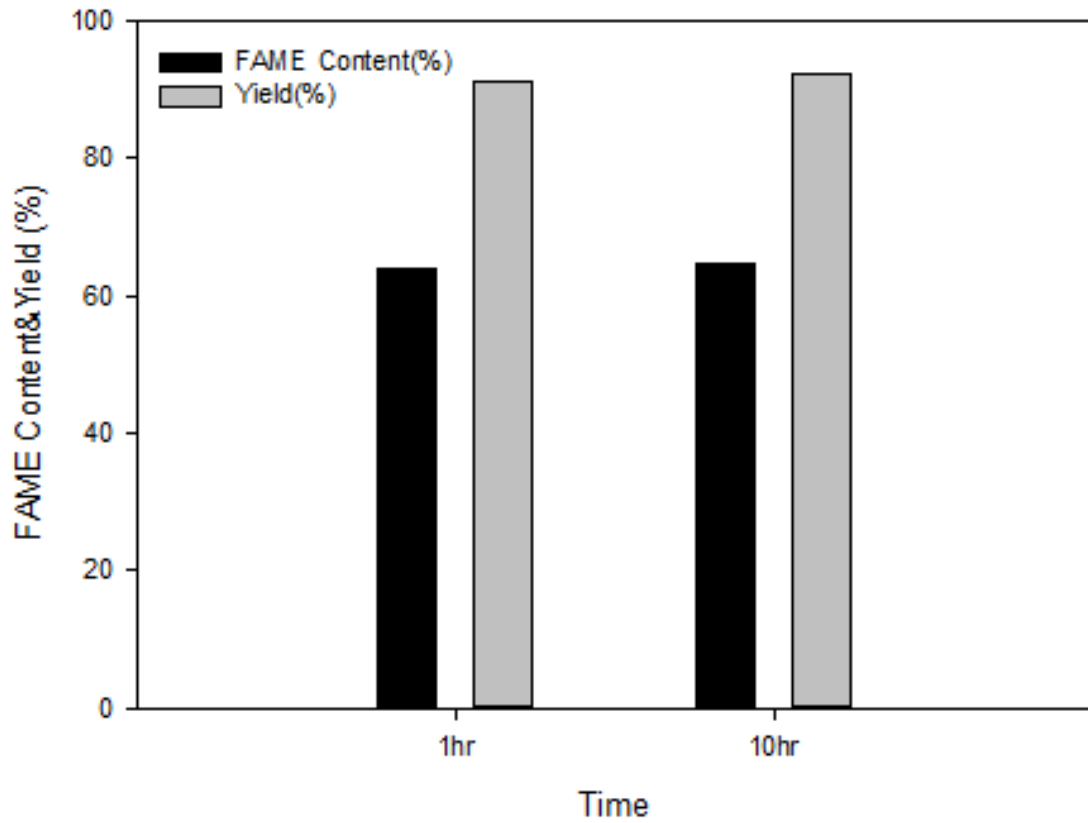


圖 4-18 最適條件比較反應時間之生質柴油產率

表 4-18 最適條件比較反應時間之數據

Time	FAME Content (%)	Yield (%)
1hr	63.81	91.18
10hr	64.59	92.14

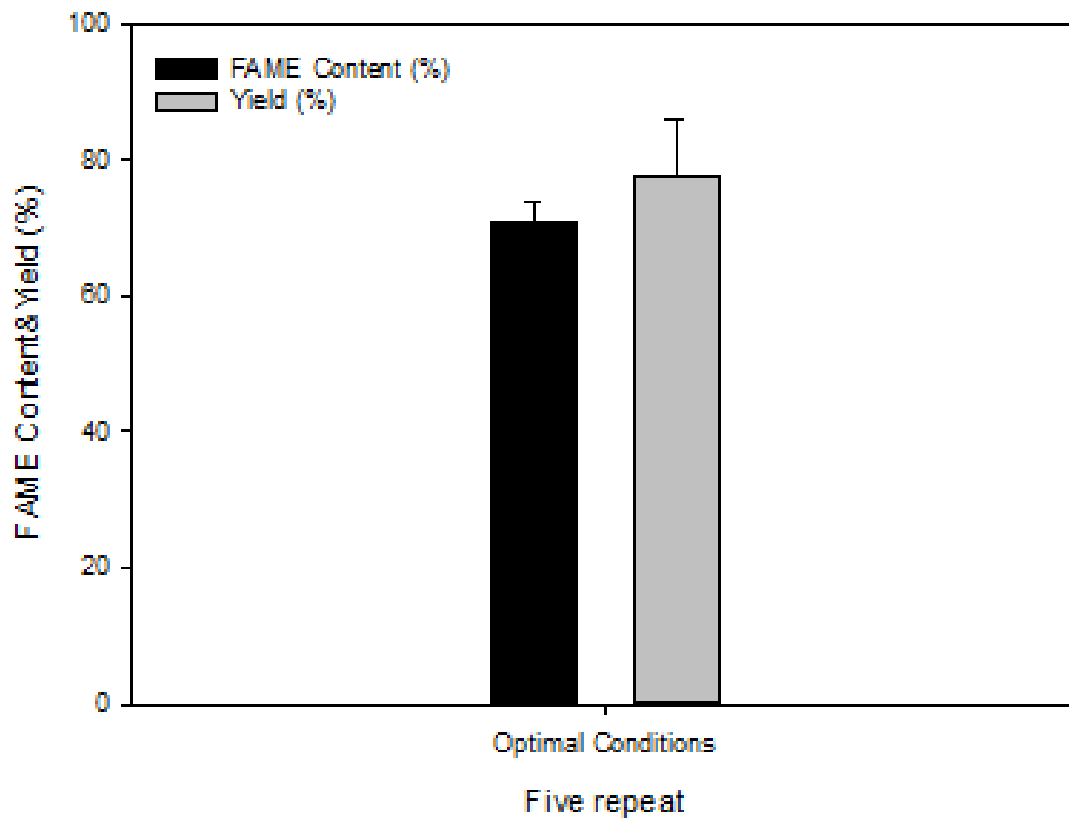


圖 4-19 直接轉酯最適條件之生質柴油產率

表 4-19 直接轉酯最適條件之數據

Conditions	FAME Content (%)	Yield (%)
2g 乾燥菌體		
80ml 甲醇		
1ml H ₂ SO ₄	70.88±2.92	77.64±8.49
溫度 70°C		
反應 1hr		

4.5.6 濕菌直接轉酯化對於生質柴油產率的影響

實驗結果如圖 4-20、表 4-20 所示，當使用乾燥菌粉添加與本身重量相等之去離子水時，與無添加任何去離子水之產率相比並無明顯差異，也可達 86.59%，但使用直接濕菌進行轉酯化使時，產率明顯下降，只剩 62.07%。

推測原因可能是當添加一定的水量時，由於反應物甲醇是一個良好的吸水性溶劑，因此可容忍一範圍內的水量，但當超過這個閾值時，水將會通過水解形成游離脂肪酸 (FFA)，消耗甲醇與催化劑的量，干擾 FAME 形成，造成產量下降。

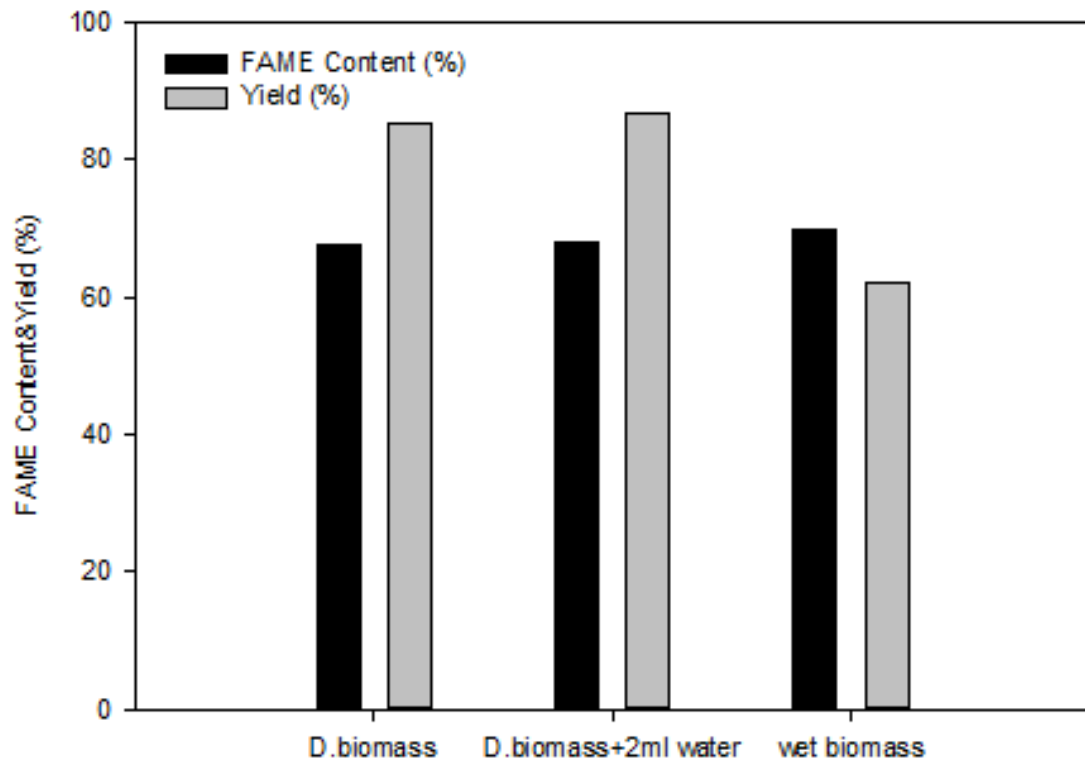


圖 4-20 濕菌直接轉酯化之生質柴油產率

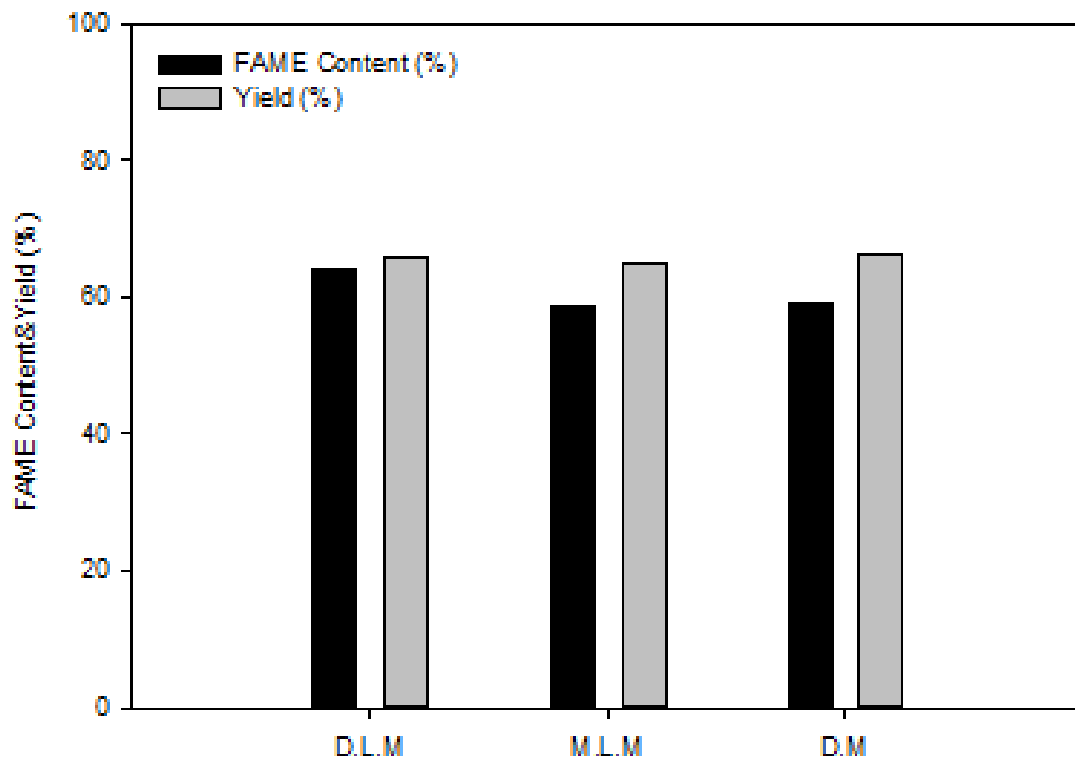
表 4-20 濕菌直接轉酯化之數據

	FAME Content (%)	Yield (%)
2g 乾燥菌體	67.43	85.12
2g 乾燥菌體+2ml Water	68.08	86.59
6.38g 濕菌(菌體=2g)	69.72	62.07

4.6 微波酸催化轉酯化

實驗以硫酸作為催化劑分別比較，兩步驟先萃取油脂再進行微波轉酯化反應和兩步驟微波萃取油脂再進行微波轉酯化反應與直接微波酸催化轉酯反應，對於 FAME 含量跟產率之影響，實驗結果如圖 4-21、表 4-21 所示。

由圖可看出先萃取油脂後去除紅酵母菌菌粉，再進行微波轉酯化之兩步驟反應；先微波萃取油脂後去除紅酵母菌菌粉，再進行微波轉酯化之兩步驟反應另一則是直接將紅酵母菌粉當作料源進行微波轉酯反應，其 FAME 含量跟產率之數值無明顯差異，因此後續將使用硫酸作為催化劑探討催化劑濃度、微波功率、時間、甲醇量等參數對生質柴油產率的影響。



D.L.M: 先萃取油脂後去除紅酵母菌菌粉，再進行微波轉酯化之兩步驟反應

M.L.M: 先微波萃取油脂後去除紅酵母菌菌粉，再進行微波轉酯化之兩步驟反應

D.T : 直接酸催化微波轉酯反應

圖 4-21 比較兩步驟轉酯化與直接微波轉酯化之生質柴油產率

表 4-21 兩步驟轉酯化與直接微波轉酯化之數據

	FAME Content (%)	Yield (%)
D.L.M	64.32	65.82
M.L.M	58.69	65.02
D.M	58.87	66.39

4.6.1 不同微波功率對於生質柴油產率之影響

實驗原本預計要探討的功率是 100W~500W，但由於微波裝置的反應器容量關係，實驗做至 300W 時，甲醇溶劑因功率太大造成突沸現象，因此考量繼續增加功率可能會造成甲醇溶劑的噴濺等安全因素，故功率的探討只 100W~300W。

實驗結果由圖 4-22、表 4-22 所示，功率 100W~300W 的 FAME 轉化率並無明顯增加，100W 和 300W 產率分別為 63.04%和 64.94%，推測原因可能是功率相差不大，導致產率並無明顯增加。

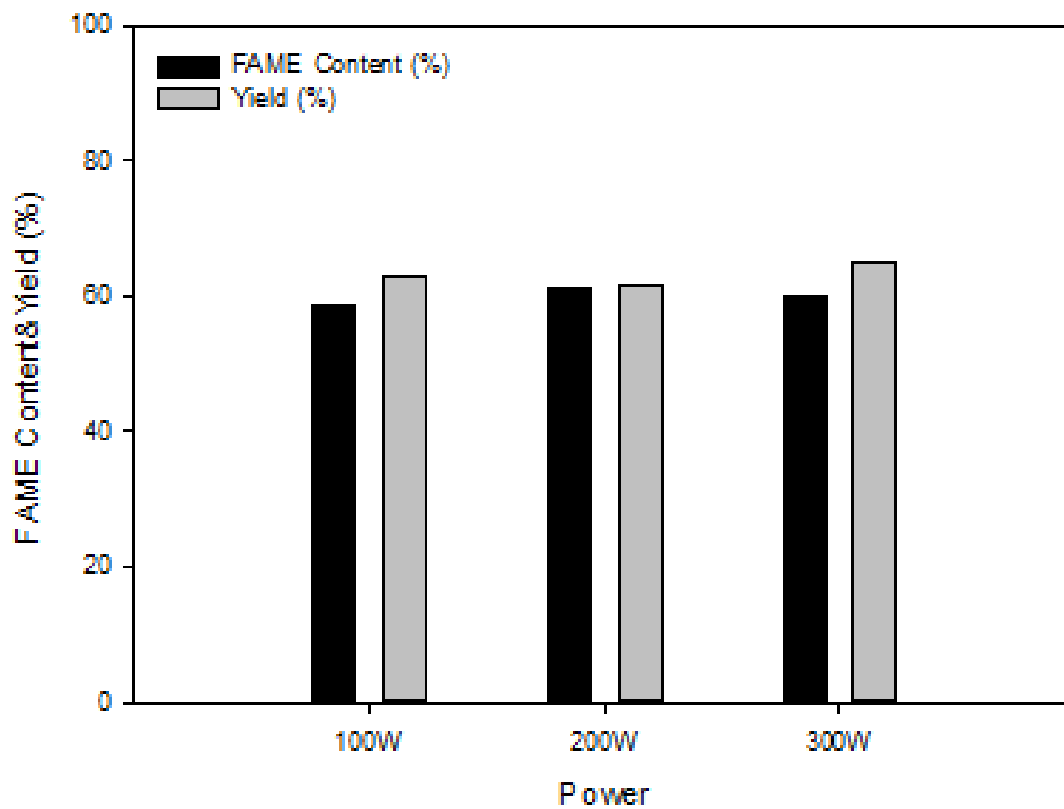


圖 4-22 不同微波功率之生質柴油產率

表 4-22 不同微波功率之數據

Power (W)	FAME Content (%)	Yield (%)
100	58.82	63.04
200	61.35	61.59
300	59.78	64.94

4.6.2 不同微波時間對於生質柴油產率之影響

實驗結果如圖 4-23、表 4-23 所示，轉酯率隨微波轉酯的反應時間而上升，在功率 100W 下反應時間為 5 分鐘，其產率可達 70.26%，但微波時間拉長至 7 分鐘與 9 分鐘時，產率又逐漸下降，結果與 Martinez 等人利用小球藻進行微波轉酯化對於探討微波時間的趨勢相符(Martinez-Guerra ,E et al.,2014)。

推測原因與直接轉酯化類似，乃是反應物中加入的硫酸，隨反應時間拉長所引起游離脂肪酸的降解。

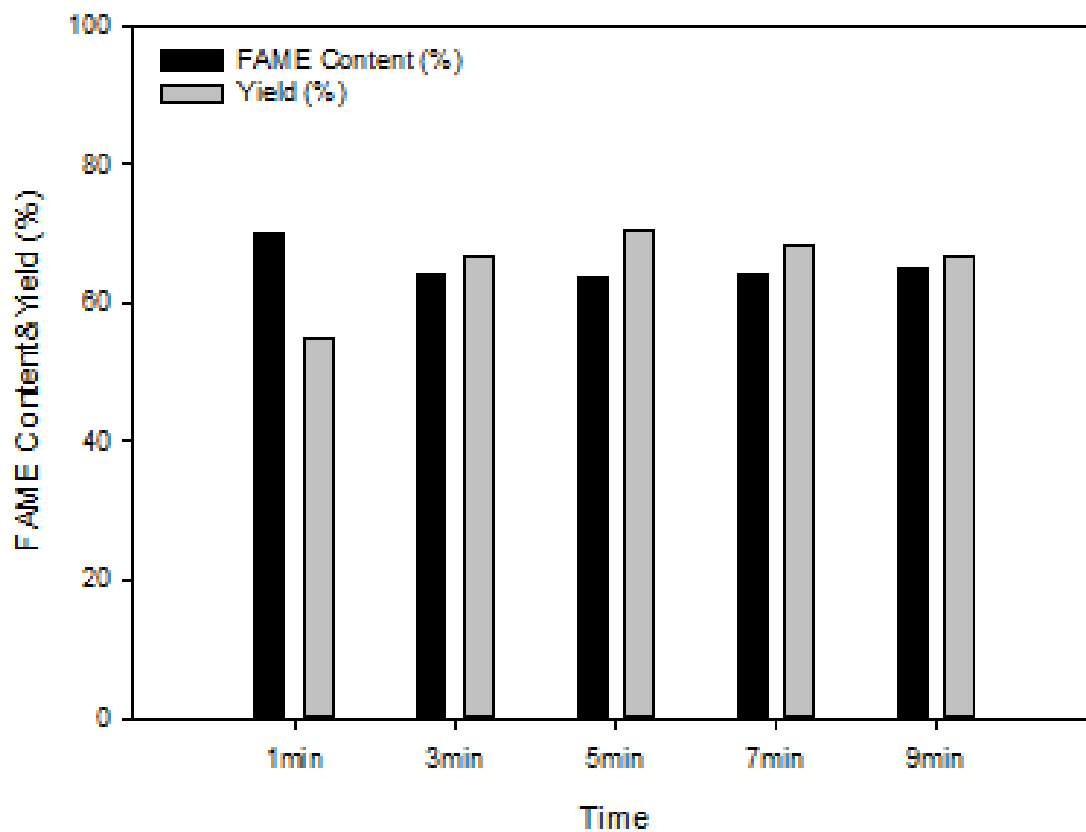


圖 4-23 不同微波時間之生質柴油產率

表 4-23 不同微波時間之數據

Time (min)	FAME Content (%)	Yield (%)
1	69.88	55.05
3	64.27	66.53
5	63.82	70.26
7	63.95	68.37
9	64.84	66.49

4.6.3 不同甲醇比例生質柴油產率之影響

如圖 4-24、表 4-24 所示，本實驗結果菌重與甲醇的比例以 1:40 為最佳產率，可達 73.61%，然而當比例增加至 1:50，產率反而下降至 63.06%，結果與 Martinez 等人利用小球藻進行微波轉酯化對於探討甲醇比例的趨勢相似，(Martinez-Guerra ,E et al.,2014)。

其原因與直接轉酯化類似，根據 Alamu 等人的研究成果，觀察到生質柴油產量隨著油醇比例的增加而增加，但上限僅能增加至閾限值，乃是因為酯交換反應為一個化學平衡反應，其油醇的質量比對於產量的影響是雙向的(Alamu et al.,2007)。

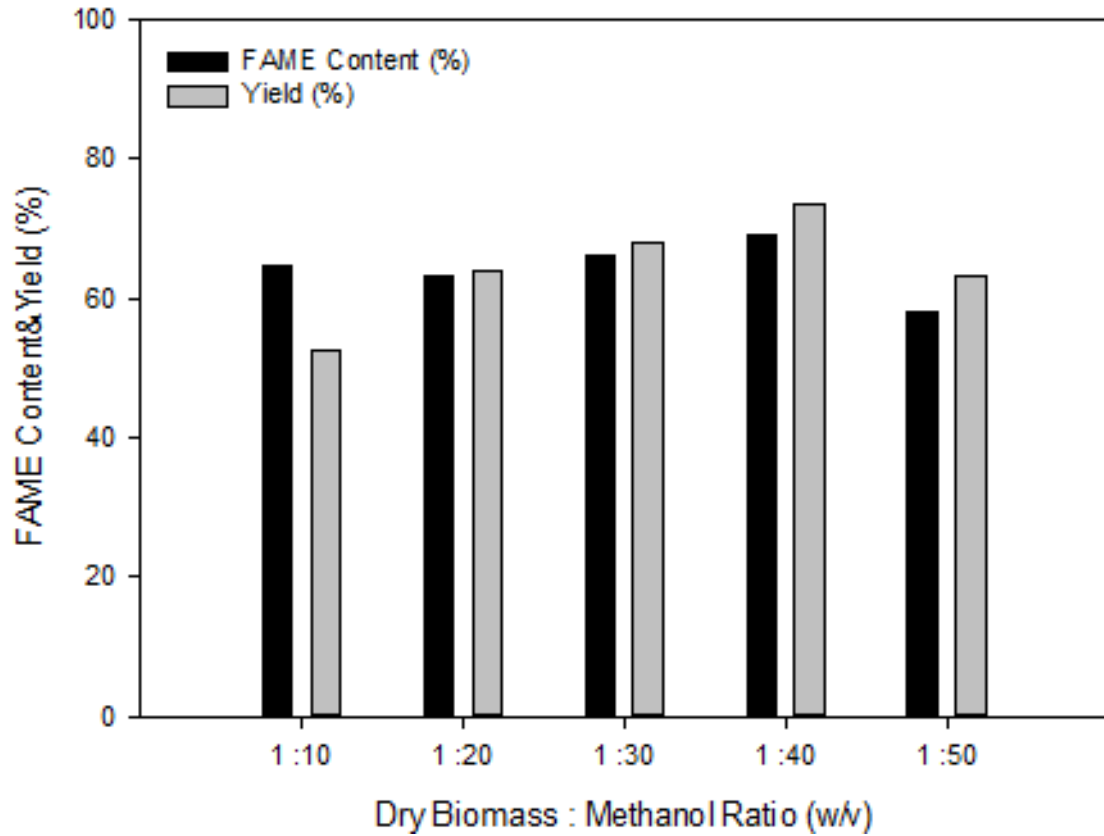


圖 4-24 不同甲醇比例之生質柴油產率

表 4-24 不同甲醇比例之數據

Biomass/Methanol(w/v)	FAME Content (%)	Yield (%)
1:10	64.69	52.54
1:20	63.14	64.02
1:30	66.10	68.09
1:40	69.10	73.61
1:50	58.15	63.06

4.6.4 不同催化劑含量對於生質柴油產率的影響

本實驗係以脂質之重量添加不同硫酸體積比(w/v)作為探討，實驗結果如圖 4-25、表 4-25 所示，當添加催化劑含量升高時，其產率也隨之上升。本實驗作為料源之菌體稱取 2 克重，內含脂質重量為 1 克重(lipid content 約 50%)，當硫酸添加至 1ml 時，脂質重比硫酸體積(w/v)為 1:1，其產率可達到 69.64%。

其原因與直接轉酯化類似，根據 Mondala 等人的實驗結果，當催化劑濃度低時，反應速率相對較慢，增加催化劑的濃度能使生質柴油的產率增加 (Mondala et al.,2009)。但催化劑濃度進一步增加時會導致產量略有下降，其原因根據 Takisawa 等人的實驗得知，過量的硫酸會降解游離脂肪酸(Takisawa et al., 2013)；此外，過量的硫酸也可促進聚合含有雙鍵的不飽和脂肪酸 (Erhan et al.,1994)，這兩種因素皆會將低生質柴油產量。

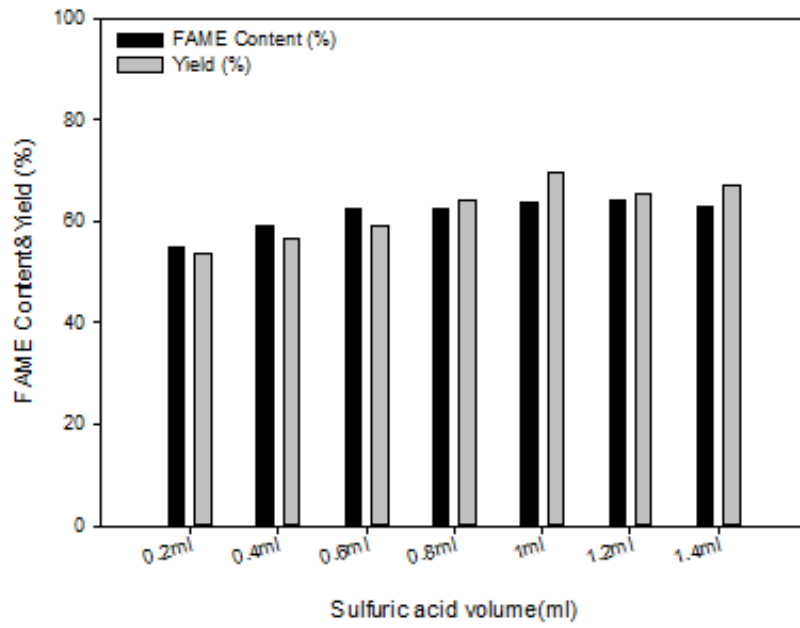


圖 4-25 不同催化劑濃度之生質柴油產率

表 4-25 不同催化劑含量之數據

1g lipid add	FAME Content (%)	Yield (%)
H ₂ SO ₄ volume (ml)		
0.2	54.77	53.59
0.4	59.26	56.36
0.6	62.37	59.08
0.8	62.24	64.28
1.0	63.71	69.64
1.2	63.93	65.57
1.4	62.77	67.06

4.6.5 微波酸催化轉酯化之最適條件

綜合上述功率、時間、甲醇量與催化劑濃度等參數，最適條件以 2g 乾燥菌體、甲醇 80ml 添加 1ml 之 H_2SO_4 (濃度為 0.235M)，反應功率為 100W、時間為 5min，所得之結果如圖 4-26、表 4-26 所示，其 FAME 含量為 68.27%，產率為 46.25%。

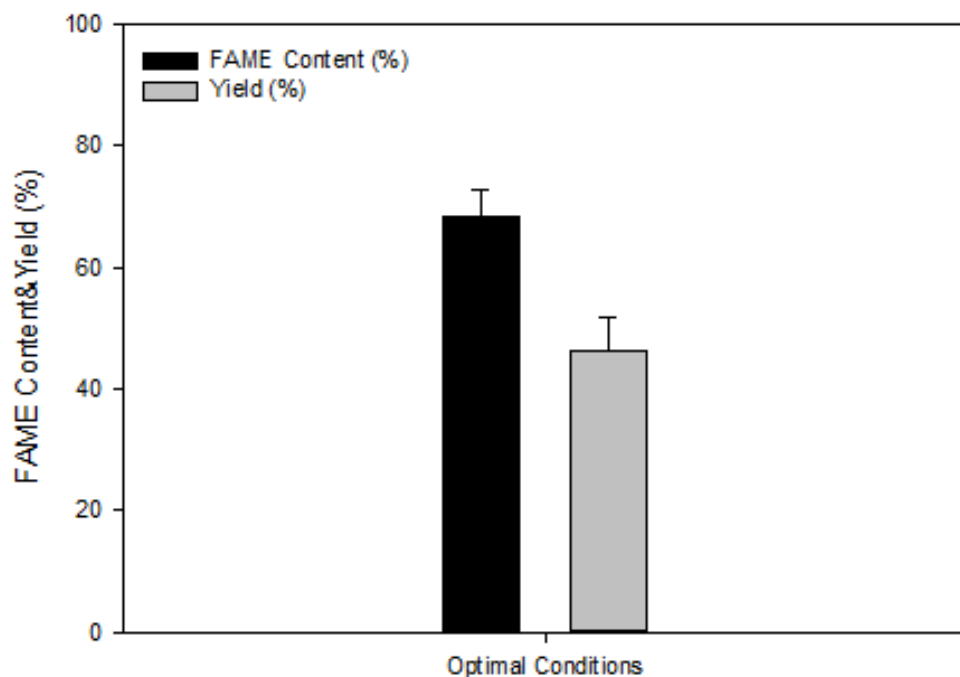


圖 4-26 微波轉酯最適條件之生質柴油產率

表 4-26 微波轉酯最適條件之數據

Conditions	FAME Content (%)	Yield (%)
2g 乾燥菌體		
80ml 甲醇		
1ml H_2SO_4	68.27±4.31	46.25±5.38
功率 100W 反應 5min		

4.6.6 濕菌微波轉酯化對於生質柴油產率之影響

實驗結果如圖 4-27、表 4-27 所示，當使用乾燥菌粉添加與本身重量相等之去離子水時，與無添加任何去離子水之產率相比並無明顯差異，產率也可達 47.70%，但使用直接濕菌進行轉酯化使時，產率明顯下降，只剩 39.95%。

推測原因可能是當添加一定的水量時，由於反應物甲醇是一個良好的吸水性溶劑，因此可容忍一範圍內的水量，但當超過這個閾值時，水將會通過水解形成游離脂肪酸 (FFA)，消耗甲醇與催化劑的量，干擾 FAME 形成，造成產量下降。

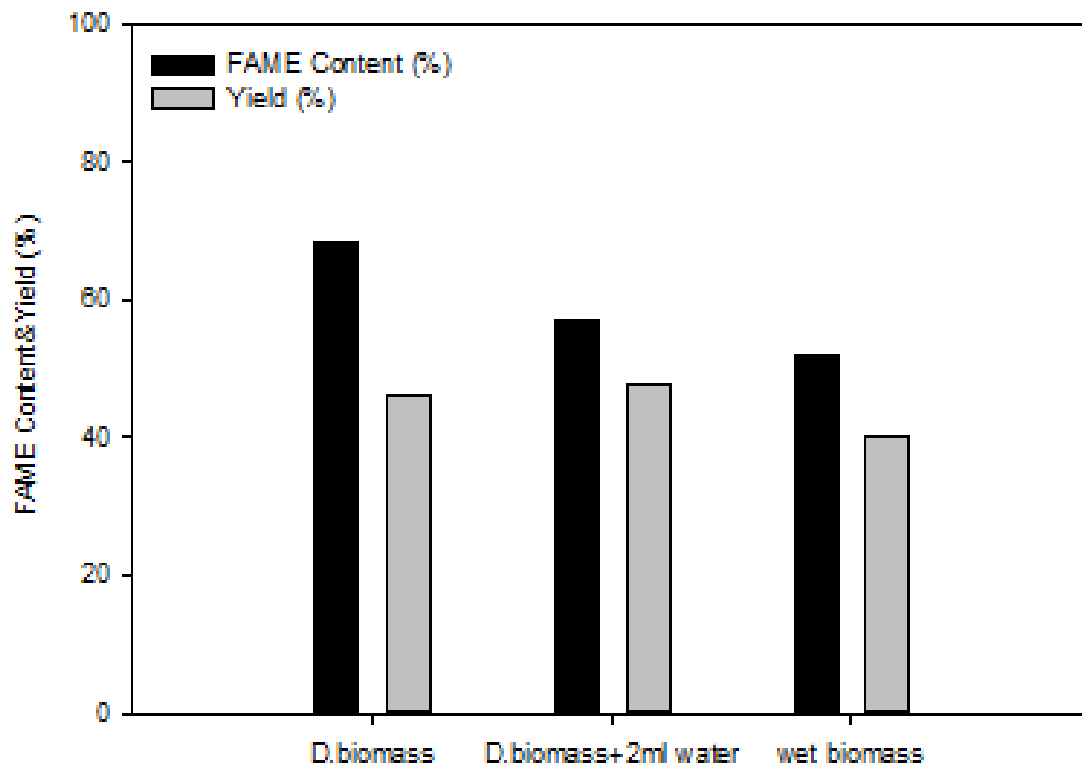


圖 4-27 濕菌微波轉酯化之生質柴油產率

表 4-27 濕菌微波轉酯化之數據

	FAME Content (%)	Yield (%)
2g 乾燥菌體	68.27	46.25
2g 乾燥菌體+2ml Water	57.02	47.70
6.38g 濕菌(菌體=2g)	52.07	39.95

4.7 酸催化轉酯綜合探討

酸催化轉酯本實驗分成直接轉酯化與直接微波轉酯化，直接轉酯化分別探討反應時間、溫度、添加甲醇量、催化劑含量以及使用濕菌進行轉酯化對於 FAME 產率之影響；直接微波轉酯化則分別探討反應功率、溫度、添加甲醇量、催化劑含量以及使用濕菌進行轉酯化對於 FAME 產率之影響。綜合上述變因，得到本實驗最適轉酯化條件，實驗結果如表 4-28 所示。

在直接轉酯化與微波轉酯化最適條件，其 FAME Content 分別為 70%與 68%，相差不大；但生質柴油產率卻分別為 77%與 46%，產率大約相差了 30%，是一個頗大的差距。而此實驗驗證將黏紅酵母當作生質柴油的料源直接進行轉酯是可行的，且比使用為微波轉酯可得到更高的產率。另外雖然微波轉酯之產率較低，原因可能跟實驗所用的微波裝置，因其容量較小而導致無法更進一步使用較高的功率進行探討，但初步結果證實微波轉酯能快速將脂質轉變成生質柴油，且其 FAME Content 與直接轉酯化相差甚小。

而使用最適轉酯化條件將濕菌直接進行轉酯化與微波轉酯，可以發現含水量對於生質柴油產率的影響甚劇；然而使用乾燥菌體添加與其等重之水量，其對於生質柴油產率的影響似乎不太顯著，與完全使用乾燥菌體進行轉酯化之產率相差不大，所以初步預計使用不完全乾燥之菌體進行轉酯化是可行的。

表 4-28 比較直接轉酯化與微波轉酯化之數據

直接轉酯化			微波轉酯化		
綜合變因之 最適條件	FAME Content (%)	Yield (%)	綜合變因之 最適條件	FAME Content (%)	Yield (%)
2g 乾燥菌體 80ml 甲醇 1ml H ₂ SO ₄ 溫度 70°C 反應 1hr	70.88±2.92	77.64±8.49	2g 乾燥菌體 80ml 甲醇 1ml H ₂ SO ₄ 功率 100W 反應 5min	68.27±4.31	46.25±5.38
2g 乾燥菌體 添加 2ml 水 80ml 甲醇 1ml H ₂ SO ₄ 溫度 70°C 反應 1hr	68.08	86.59	2g 乾燥菌體 添加 2ml 水 80ml 甲醇 1ml H ₂ SO ₄ 功率 100W 反應 5min	57.02	47.70
6.38g 濕菌 (等同 2g 之 菌體) 80ml 甲醇 1ml H ₂ SO ₄ 溫度 70°C 反應 1hr	69.72	62.07	6.38g 濕菌 (等同 2g 之 菌體) 80ml 甲醇 1ml H ₂ SO ₄ 功率 100W 反應 5min	52.07	39.95

表 4-29 轉酯化製程實驗與文獻之比較

Microorganisms /lipid content (%)	Conditions	FAME content	Yield	Reference
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4/59%.	1:20 (w/v) 4 g/ L NaOH 10 h reaction time at 50°C	-----	97.7%	(Thliveros et al., 2014)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4/59%.	1:20 (w/v) 39.2 g/L H ₂ SO ₄ 10 h reaction time at 70°C	-----	95.0%	(Thliveros et al., 2014)
<i>R. toruloides</i> /58.0%	1:20 (w/v) 0.2 mol/L H ₂ SO ₄ 20hr reaction time at 70°C	-----	98.1%	(Liu et al.,2010)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	100 mg+ 4 ml methanol,8 ml n-Hexane 0.5 M H ₂ SO ₄ 3hr reaction time at 120°C	93.2%	92.5%	(Cao et al.,2013)
<i>Algal</i>	microwaves – 1:12 algae to ethanol (wt./vol.) 2 wt.% base catalyst 6 min reaction time at 350W	-----	96.2%	(Martinez-Guerra et al.,2014)

	ultrasound			
<i>Algal</i>	1:12 algae to ethanol (wt./vol.) 2 wt.% base catalyst 6 min reaction time at 490W	-----	95.0%	(Martinez-Guerra et al.,2014)
<i>Y. lipolytica TISTR 5151/22.5%</i>	1:209(w/v) 0.4M H ₂ SO ₄ 1hr reaction time at 50 °C	71.91 ± 0.66%	-----	(Louhasakul et al.,2013)
<i>R. gluyinis/50%</i>	1:40 (w/v) 0.235M H ₂ SO ₄ 1hr reaction time at 70 °C	70.88±2.92%	77.64±8.49%	This study
<i>R. gluyinis/50%</i>	microwaves 1:40 (w/v) 0.235M H ₂ SO ₄ 5 min reaction time at 100W	68.27±4.31%	46.25±5.38%	This study

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

本研究利用 *Rhodotorula glutinis* 進行不同方式之油脂萃取與酸催化轉酯之探討以下整理列出幾點結論：

1. 微生物之油脂萃取傳統上都會先利用機械式，如高壓破壁或超音波輔助破細胞，破壞微生物之細胞壁使脂質釋出。然而單純的使用甲醇萃取液不經破壁這道程序便能萃取出與傳統萃取方式相當之油脂量，可節省許多前處理與有機溶劑的消耗。
2. 使用乾燥菌體添加水溶液，模擬濕菌萃取的結果，不管使用超音波輔助或是直接萃取，初步結果顯示在含水量低的情況下似乎對於油脂萃取不會造成太顯著的影響，因此關於使用未完全乾燥之菌體來進行油脂萃取應該是可行的，將能省去繁雜的洗菌、凍乾菌體之前處理，也大大節省了能源的損耗。
3. 直接轉酯化與微波轉酯化其 FAME Content 大致落在 60~70% 之間，較無太大的差異，然而直接轉酯化其生質柴油產率遠高於微波轉酯化。而雖然使用微波轉酯可以快速得到 FAME，但由於產率偏低，加上如果要放大製成，恐怕微波反應裝置無法製造出符合的規模，因此簡化 SCO 生產生質柴油之步驟，將能有效降低成本，更接近商業化之目標，還是以直接轉酯化較為可行。
4. 直接轉酯化以乾燥菌體添加水溶液，模擬濕菌轉酯進行轉酯化的結果，在使用乾燥菌體添加等重之水量下進行轉酯化，其生質柴油產率無太大的變化，因此初步認為使用未完全乾燥之菌體進行轉酯化是可行的，將能省去繁雜的洗菌、凍乾菌體之前處理，節省了能源的損耗，有效降低成本。

5.2 未來展望

目前關於直接轉酯化微生物生產生質柴油之相關研究，以微藻為主。相較之下，以酵母菌為料源進行直接轉酯化的相關研究少了許多。本實驗使用 *Rhodotorula glutinis* 進行不同催化方式將酵母菌內油脂直接轉化為生質柴油，並進一步嘗試以未除水的菌體做料源，結合微波加速反應進行，期望未來能建立以未完全乾燥紅酵母為料源之直接轉酯化製程，脂肪酸甲酯含量>80%。期望能提出簡單、低成本及高產率之直接轉酯化方法，有助於國內能源工業技術之提昇。

參考文獻

- 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。
- 劉懿嫻(2014)。以粗乾油作為碳源探討利用氣舉式發酵槽培養 *Rhodotorula glutinis* 生產 β -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所碩士論文。
- 許惠美(2010)。生質柴油規範及測試方法的評估。國立台北科技大學化學工程研究所碩士論文。
- 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。
- 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。東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。
- Alamu, O. J., Waheed, M. A., & Jekayinfa, S. O. (2008). Effect of ethanol-palm kernel oil ratio on alkali-catalyzed biodiesel yield. *Fuel*, 87(8), 1529-1533.
- Carvalho, A. P., & Malcata, F. X. (2005). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of marine lipids: insight studies. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(13), 5049-5059.
- Cao, H., Zhang, Z., Wu, X., & Miao, X. (2013). Direct biodiesel production from wet microalgae biomass of *Chlorella pyrenoidosa* through in situ transesterification. *BioMed research international*.
- Celik, E., Ozbay, N., Oktar, N., & Çalık, P. (2008). Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(9), 2985-2990.
- Cortes, M. A. L., & de Carvalho, C. C. (2015). Effect of carbon sources on lipid accumulation in *Rhodococcus* cells. *Biochemical Engineering Journal*, 94, 100-105.
- Danesi E.D.G., Rangel-Yagui C.O., Carvalho J.C.M., Sato S. (2004). Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by

Spirulina platensis. *Biomass and Bioenergy*, 26:329-335

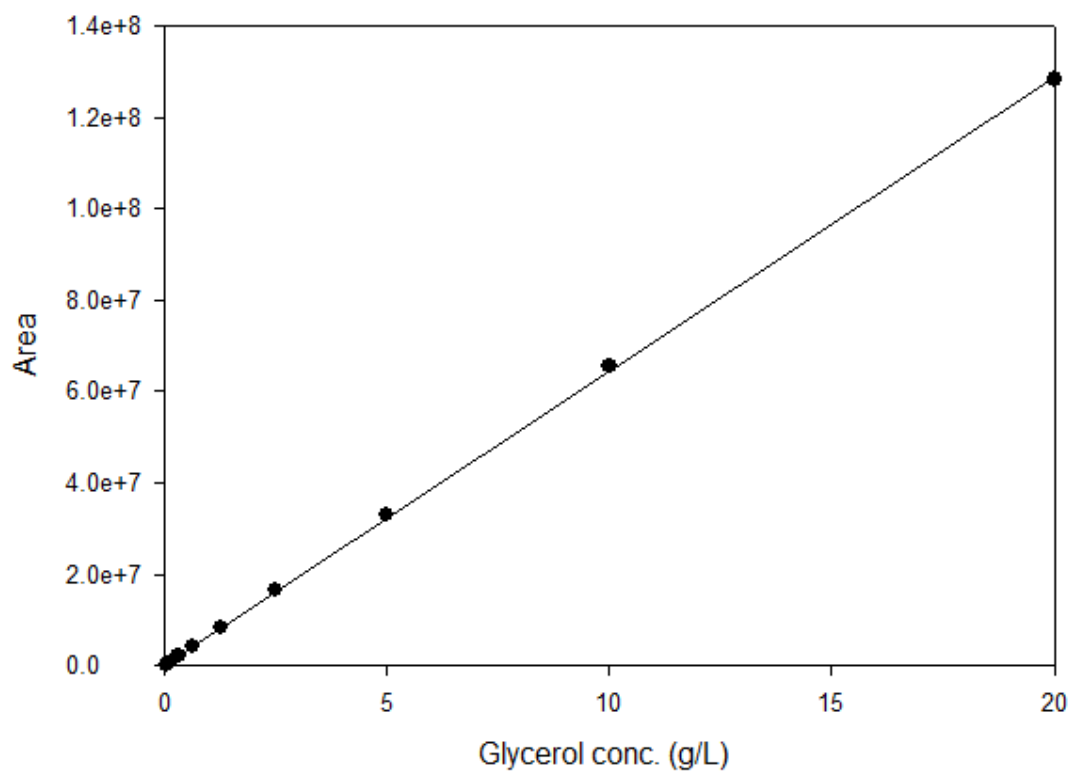
- Demirbas, A. (2007). Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy policy*, 35(9), 4661-4670.
- Eevera, T., Rajendran, K., & Saradha, S. (2009). Biodiesel production process optimization and characterization to assess the suitability of the product for varied environmental conditions. *Renewable Energy*, 34(3), 762-765.
- Ehimen, E. A., Sun, Z. F., & Carrington, C. G. (2010). Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel*, 89(3), 677-684.
- Erhan, S. Z., & Bagby, M. O. (1994). Polymerization of vegetable oils and their uses in printing inks. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(11), 1223-1226.
- Freedman, B. E. H. P., Pryde, E. H., & Mounts, T. L. (1984). Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(10), 1638-1643.
- Fukuda, H., Kondo, A., & Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(5), 405-416.
- Goering, C. E., & Fry, B. (1984). Engine durability screening test of a diesel oil/soy oil/alcohol microemulsion fuel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(10), 1627-1632.
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource technology*, 102(1), 178-185.
- Hidalgo, P., Toro, C., & Navia, R. (2013). Advances in direct transesterification of microalgal biomass for biodiesel production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(2), 179-199.
- Johnson, M. B., & Wen, Z. (2009). Production of biodiesel fuel from the microalga *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. *Energy & Fuels*, 23(10), 5179-5183.
- Lee, J. Y., Yoo, C., Jun, S. Y., Ahn, C. Y., & Oh, H. M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource technology*, 101(1), S75-S77.

- Li, Q., Du, W., & Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(5), 749-756.
- 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.
- Liu, B., & Zhao, Z. K. (2007). Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82(8), 775-780.
- Liu, Y., Wang, Y., Liu, H., & Zhang, J. A. (2015). Enhanced lipid production with undetoxified corn cob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy. *Bioresource technology*, 180, 32-39.
- Lotero, E., Liu, Y., Lopez, D. E., Suwannakarn, K., Bruce, D. A., & Goodwin, J. G. (2005). Synthesis of biodiesel via acid catalysis. *Industrial & engineering chemistry research*, 44(14), 5353-5363.
- Malisorn, C., & Suntornsuk, W. (2008). Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology*, 99(7), 2281-2287.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable energy*, 34(1), 1-5.
- Mondala, A., Liang, K., Toghiani, H., Hernandez, R., & French, T. (2009). Biodiesel production by in situ transesterification of municipal primary and secondary sludges. *Bioresource Technology*, 100(3), 1203-1210.
- Niehaus, R. A., Goering, C. E., Savage, L. D., & Sorenson, S. C. (1986). Cracked soybean oil as a fuel for a diesel engine. *Transactions of the ASAE*, 29(3), 683-689.
- Pestes, M. N., & Stanislaw, J. (1984). Piston ring deposits when using vegetable oil as a fuel. *Journal of Testing and Evaluation*, 12(2), 61-68.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86(11), 807-815.
- Schwab, A. W., Bagby, M. O., & Freedman, B. (1987). Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. *Fuel*, 66(10), 1372-1378.

- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., & Roessler, P. (1998). A look back at the US Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. *National Renewable Energy Laboratory*, 328.
- Subhash, G. V., & Mohan, S. V. (2011). Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Aspergillus* sp. using corncob waste liquor as a substrate. *Bioresource technology*, 102(19), 9286-9290.
- Suh, W. I., Mishra, S. K., Kim, T. H., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., ... & Yang, J. W. (2015). Direct transesterification of wet microalgal biomass for preparation of biodiesel. *Algal Research*, 12, 405-411.
- Takisawa, K., Kanemoto, K., Kartikawati, M., & Kitamura, Y. (2013). Simultaneous hydrolysis-esterification of wet microalgal lipid using acid. *Bioresource technology*, 149, 16-21.
- Thliveros, P., Kiran, E. U., & Webb, C. (2014). Microbial biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous biomass. *Bioresource technology*, 157, 181-187.
- 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.
- Ullah, Z., Bustam, M. A., & Man, Z. (2015). Biodiesel production from waste cooking oil by acidic ionic liquid as a catalyst. *Renewable Energy*, 77, 521-526.
- Yoon, S. H., & Rhee, J. S. (1983). Lipid from yeast fermentation: effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(7), 1281-1286.

附錄

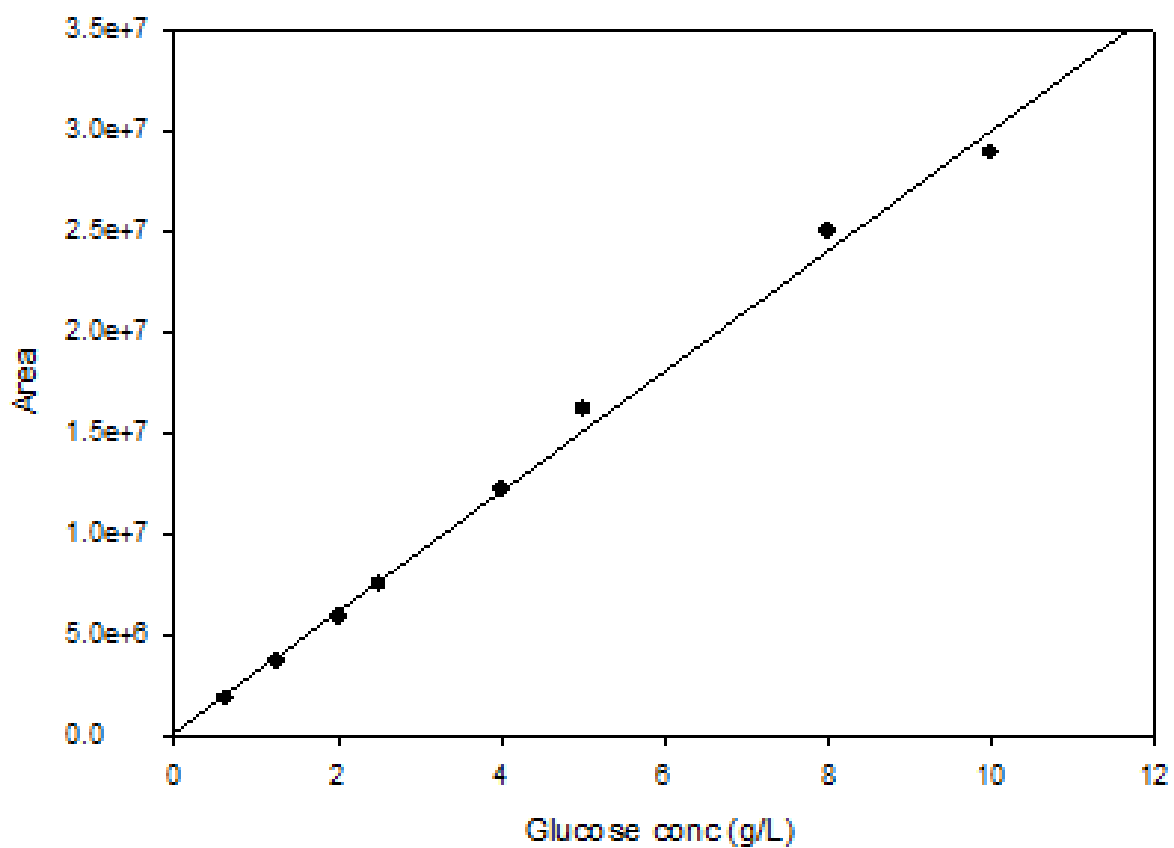
甘油檢量線



Glycerol 標準檢量線方程式：

$$\text{Glycerol conc.} = (\text{Peak area} - 248872) / 600000$$

葡萄糖檢量線



Glucose 標準檢量線方程式：

$$\text{Glucose conc.} = (\text{Peak area} + 218880) / 3000000$$

Certificate of Analysis

Description: F.A.M.E. Mix C8-C24, 100mg, Neat

Part Number: CRM18918

Lot Number: XA11167V

Expiration Date: January 2018

Storage: Freeze

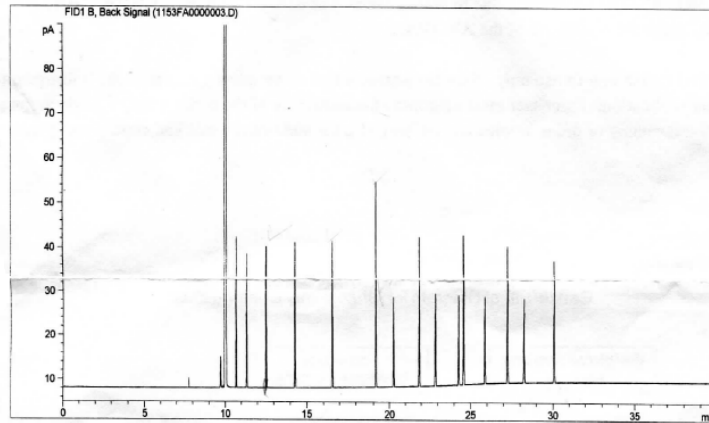
Analytical Method Parameters:

Column: SP-2560 100m x .25mm x 0.2µm

140°C to 240°C at 4°C/min, 15 min hold

Detector: 260 °C

Injection Volume: 1µL



Elution	Analyte	Lot Number	CAS Number	Chromatographic Purity %	Certified Weight %	Expanded Uncertainty %	Analytical Weight %
	Internal Standard	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2.	Methyl octanoate	LB97319	111-11-5	99.9	8.0	±0.51	8.2
3.	Methyl decanoate	LC04160	110-42-9	99.9	8.0	±0.47	8.2
4.	Methyl laurate	LB97659	111-82-0	99.9	8.0	±0.44	8.2
5.	Methyl tetradecanoate	LB97558	124-10-7	99.9	8.0	±0.43	8.1
6.	Methyl palmitate	LC02625	112-39-0	99.9	11.0	±0.62	11.2
7.	Methyl Palmitoleate	LC05477	1120-25-8	99.9	5.0	±0.27	5.0
8.	Methyl octadecanoate	LB97274	112-61-8	99.9	8.0	±0.50	8.1
9.	cis-9-Oleic methyl ester	LC02936	112-62-9	99.9	5.0	±0.31	5.1
10.	Methyl Linoleate	LC06225	112-63-0	98.9	5.0	±0.32	5.1
11.	Methyl Arachidate	LC05925	1120-28-1	99.9	8.0	±0.54	8.0
12.	Methyl Linolenate	LC03119	301-00-8	99.9	5.0	±0.31	5.0
13.	Methyl docosanoate	LC03090	929-77-1	99.7	8.0	±0.56	8.1
14.	Methyl Erucate	LB99614	1120-34-9	99.9	5.0	±0.35	5.1
15.	Methyl lignocerate	LC07615	2442-49-1	99.9	8.0	±0.56	8.2



Cert# AT-1607



Cert# AR-1606

Produced in double accredited laboratory fulfilling

**ISO/IEC 17025 and
ISO Guide 34**

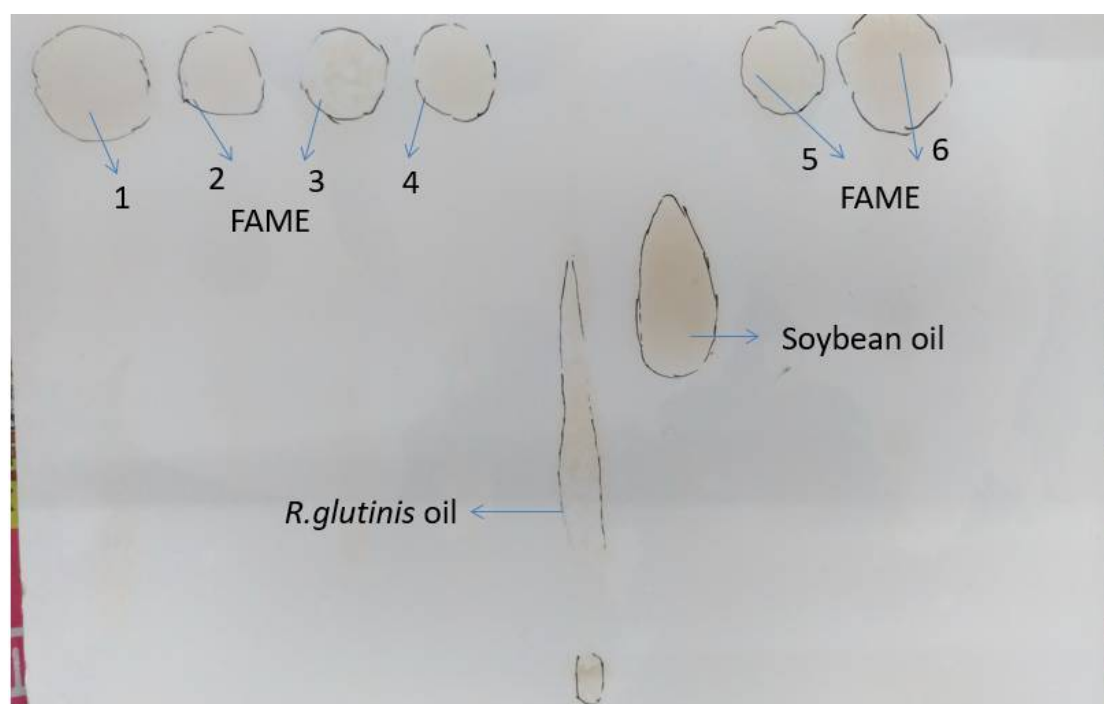
Page 1 of 2

SIGMA-ALDRICH[®]

黏紅酵母菌油脂轉酯化後主要 FAME 成分為:

- C_{16:0} Methyl palmitoleat
- C_{18:0} Methyl octadecanoate
- C_{18:1} cis-9-Oleic methyl ester
- C_{18:2} Methyl Linoleate
- C_{18:3} Methyl Linolenate

TLC 初步追蹤 FAME



轉酯後的 FAME 因分子量較小，故在 TLC 試片上被吸附的移動速度較快。
未轉酯的 Lipid 則因分子量較大，故在 TLC 試片上被吸附的移動速度較慢。
編號 1~6 依序為不同變因之 TLC 追蹤結果

- 1: 直接轉酯化探討反應時間，反應時間為 10 小時之結果。
- 2: 直接轉酯化探討反應溫度，反應溫度為 70°C 之結果。
- 3: 直接轉酯化探討甲醇比例，菌重比甲醇為 1:40 之結果。
- 4: 直接轉酯化探討催化劑硫酸體積，硫酸體積為 1ml 之結果。
- 5: 直接轉酯化最適條件之結果。
- 6: 大豆油鹼催化之結果。