

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.

探討不同發酵策略對於 *Rhodotorula glutinis* 生長及累積油脂

之影響

Effect of fermentation strategy on cell growth and total lipid

accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*

研究生：張智勇 撰

Graduate student : Zhiyong Zhang

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

中文摘要

Rhodotorula glutinis (BCRC 22360) 是一株可累積高脂質含量之油脂性酵母菌，其細胞生長迅速、可達高密度細胞培養，且油脂成分類似於植物油，因此具有相當高發展潛力，可作為生質柴油生產之替代性油料的來源之一。本研究主要探討利用不同發酵策略提升 *R. glutinis* 生長及累積油脂，進而提高整體油脂生產速率。

由搖瓶批次實驗發現以葡萄糖當作碳源，較易於細胞生長及油脂累積；而高溶氧(低裝液量或者高轉速)、照光、培養溫度為 24~30°C 下，將有助於細胞生長；相反在低溶氧(高裝液量、低轉速)、不照光(暗室)、較高碳源濃度、較低氮源濃度、培養溫度為 24°C 下，則有助於油脂累積。

由批次(改變起始葡萄糖濃度、溶氧量控制、兩階段溶氧與光強度控制條件)與饋料批次(改變葡萄糖濃度、兩階段溶氧控制與三盞 LED 光源)策略中，以發酵策略為兩階段溶氧搭配單次饋料與三盞 LED 光源搭配連續饋料能獲得較佳之結果。但從油脂生產速率與商業化角度來看，以三盞 LED 光源搭配連續饋料策略較有利於後續的研究與發展，其細胞生長速率高達 0.88 g/l/hr 且有不錯之平均油脂含量(54.5%)，因此，可得較佳之油脂生產速率(0.39 g/l/hr)。

R. glutinis 之油脂成分，主要以油酸(C18:1)占 50~60%、棕櫚酸(C16:0)占 20~30%兩者的比例最高。

關鍵字：*R. glutinis*、微生物油脂、影響因子、發酵策略

Abstract

Rhodotorula glutinis (BCRC 22360) is an oleaginous yeast that can accumulate copious quantities of lipids. *R. glutinis* grew fast to obtain high biomass concentration, and comparable with plant seed oil, therefore it is all potential alternative oil resources for biodiesel production. This investigation used different fermentation strategies to enhance the growth of *R. glutinis* and accumulation of oil, thereby increasing overall oil productivity.

In the flask batch experiment with glucose as the carbon source that is easier on the cell growth and fat accumulation. Under conditions of high dissolved oxygen (low medium volume or high shaking speed), irradiation and 24~30°C, will contribute to cell growth. On the contrary, under conditions of low dissolved oxygen (high medium volume, low shaking speed), no irradiation (dark), higher carbon concentration, lower nitrogen concentration and 24°C, will contribute to fat accumulation.

From the batch (change initial glucose concentration, dissolved oxygen control, two-stage dissolved oxygen control and light intensity control) and fed-batch (change glucose concentration, two-stage dissolved oxygen control and three LED light source irradiation, the strategy are two-stage dissolved oxygen control with one feeding and three LED light source irradiation with continuous feeding, can obtain better results. In the microbial oil productivity and the commercial point of view, the three LED

light source irradiation with continuous feeding strategy will more beneficial to follow-up research and development. Results of the three LED light source irradiation with continuous feeding strategy could lead to the highest cell growth rate of 0.88 g/l/hr and the good average lipid content of 54.5%, then got better oil productivity of 0.39 g/l/hr.

In addition, the main composition of the microbial lipid from *R. glutinis* were oleic acid (C18:1) of 50~60% and palmitic acid (C16:0) of 20~30%, which was similar with that of vegetable oil.

Keywords: *R. glutinis* 、 microbial oil 、 impact factor 、 fermentation strategy

誌謝

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 楊芳鏘教授，在實驗上給我許多建議與指點，促使我的研究更加順利與完整。感謝 虎尾生科所 張耀南教授提供寶貴的實驗菌株與指點。感謝 東海化工所 楊怡寬教授、虎尾生科所 張耀南教授、中興化工所 劉永銓教授，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，感謝學長昌宇、嘉麟、志昇；學姐采竹、憶芝、宜珈、于萱、怡妏的指導與照顧，另外感謝同學證雄、尚甫、靖涵、皓緯、雅婷、瑋、翌晨的相互扶持與勉勵，以及學弟欣培、偉誠、志恆、家豪、羽軒；學妹芳慈、儷娟、雅鈞在實驗上面的協助與幫忙。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，可以讓我在求學階段無後顧之憂的進行研究，謝謝你們！並再次感謝曾經幫助我的所有人。

2011年7月18日

目錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	II
誌謝.....	IV
目錄.....	V
圖目錄.....	XI
表目錄.....	XVI
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2.1 生質柴油介紹.....	2
2.2 微生物油脂介紹.....	4
2.3 油脂性微生物的介紹.....	6
2.3.1 微藻.....	6
2.3.2 細菌.....	7
2.3.3 酵母菌與真菌.....	8
2.4 菌種選擇.....	9
2.4.1 菌種介紹— <i>Rhodotorula glutinis</i>	9
2.5 微生物產油機制.....	11
2.6 影響微生物油脂產量因子.....	14

2.6.1	物理因子.....	14
2.6.1.1	培養時間.....	14
2.6.1.2	溫度.....	14
2.6.1.3	pH值.....	15
2.6.1.4	溶氧量.....	15
2.6.1.5	光.....	16
2.6.2	化學因子.....	17
2.6.2.1	碳源和氮源.....	17
2.6.2.1.1	碳源.....	17
2.6.2.1.2	氮源.....	17
2.6.2.2	無機鹽和微量元素.....	18
2.7	微生物油脂發酵策略介紹.....	18
2.7.1	批次微生物油脂發酵.....	18
2.7.2	饋料批次微生物油脂發酵.....	19
2.7.3	兩階段培養策略.....	19
第三章	材料與方法.....	20
3.1	實驗材料.....	20
3.1.1	菌株.....	20
3.1.2	實驗藥品.....	20

3.2	實驗儀器.....	22
3.3	分析方法.....	23
3.3.1	光照強度測定方法.....	23
3.3.2	菌體濃度分析方法.....	23
3.3.3	葡萄糖濃度分析方法.....	23
3.3.4	總脂質濃度分析方法.....	24
3.3.5	脂質成分分析方法.....	24
3.4	實驗方法.....	26
3.4.1	原始菌種保存.....	26
3.4.2	培養基組成.....	27
3.4.2.1	種子培養基.....	27
3.4.2.2	發酵培養基.....	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 experiment)	30
3.6.1.1	培養時間之影響.....	30
3.6.1.2	不同碳源之影響.....	30
3.6.1.3	碳源濃度之影響.....	31

3.6.1.4	氮源濃度之影響.....	31
3.6.1.5	改變 FM 體積之影響.....	31
3.6.1.6	改變轉速之影響.....	32
3.6.1.7	兩階段改變轉速之影響.....	32
3.6.1.8	不同溫度下之影響.....	33
3.6.1.9	光照強度之影響.....	33
3.6.2	攪拌式發酵槽批次程序 (batch)	33
3.6.2.1	碳源濃度之影響.....	33
3.6.2.2	控制溶氧量之影響.....	34
3.6.2.3	光強度之影響.....	34
3.6.3	攪拌式發酵槽饋料批次程序 (fed-batch)	35
3.6.3.1	控制碳源濃度之影響.....	35
3.6.3.2	兩階段溶氧量搭配單次饋料之實驗.....	36
3.6.3.3	提供三盞 LED 光源搭配連續式饋料之實驗.....	36
第四章	結果與討論.....	40
4.1	<i>R. glutinis</i> 之脂肪酸分析結果.....	40
4.2	搖瓶批次發酵程序 (flask experiment)	42
4.2.1	培養時間之影響.....	42
4.2.2	不同碳源之影響.....	44

4.2.3	碳源濃度之影響.....	46
4.2.4	氮源濃度之影響.....	48
4.2.5	改變 FM 體積之影響.....	50
4.2.6	改變轉速之影響.....	52
4.2.7	兩階段改變轉速之影響.....	54
4.2.8	不同溫度之影響.....	56
4.2.9	光照強度之影響.....	58
4.3	攪拌式發酵槽批次程序 (batch)	60
4.3.1	碳源濃度之影響.....	60
4.3.2	控制溶氧量之影響.....	64
4.3.2.1	兩階段溶氧量控制之影響.....	67
4.3.3	光強度之影響.....	69
4.4	攪拌式發酵槽饋料批次程序 (fed-batch)	73
4.4.1	控制碳源濃度之影響.....	73
4.4.2	兩階段溶氧量搭配單次饋料之實驗.....	77
4.4.3	提供三盞 LED 光源搭配連續式饋料之實驗.....	80
4.5	發酵策略之比較.....	83
第五章	結論與未來展望.....	89
5.1	結論.....	90

5.2 未來展望.....	91
參考文獻.....	92
附錄.....	98
附錄 A 菌體乾重(biomass)檢量線.....	98
附錄 B.1 Methyl tetradecanoate (C14:0)標準檢量線.....	99
附錄 B.2 Methyl palmitate (C16:0) 標準檢量線.....	100
附錄 B.3 Palmitoleic acid methyl ester (C16:1) 標準檢量線.....	101
附錄 B.4 Methyl stearate (C18:0) 標準檢量線.....	102
附錄 B.5 ethyl oleate (C18:1) 標準檢量線.....	103
附錄 B.6 Linoleic acid methyl ester (C18:2) 標準檢量線.....	104
附錄 B.7 Linolenic acid methyl ester (C18:3) 標準檢量線.....	105
作者簡歷.....	106

圖目錄

圖 2-1 實驗室利用沙拉油進行鹼催化反應生產，右圖上層為轉脂化之生質柴油，下層為粗製甘油.....	3
圖 2-2 藻類開放式系統培養示意圖.....	7
圖 2-3 左: <i>Rhodotorula glutinis</i> 之搖瓶批次培養裝置圖；右: <i>Rhodotorula glutinis</i> 之 5L 發酵槽批次培養裝置圖.....	9
圖 2-4 (a) 為用光學顯微鏡，再放 400 倍下所觀察到 <i>Rhodotorula glutinis</i> 的細胞型態，呈圓形或卵圓形；(b) 為用倒立式螢光顯微鏡(添加 Nile red)，在 400 倍所觀察到 <i>Rhodotorula glutinis</i> 的細胞顏色為紅色.....	10
圖 2-5 A scheme to show how the citrate/malate cycle and the cytosolic 'transhydrogenase' cycle could provide sufficient precursors of acetyl-CoA and NADPH for lipogenesis in oleaginous microorganisms.....	12
圖 2-6 A diagram to show the organization of a hypothesized lipogenic metabolon.....	13
圖 3-1 <i>Rhodotorula glutinis</i> 在 agar plate 上之外觀.....	20
圖 3-2 脂肪酸分析之樣品前處理流程圖.....	25
圖 3-3 實驗架構.....	29
圖 3-4 (a) 批次發酵裝置圖；(b) 饋料批次發酵裝置圖(饋料碳源為 500 g/l)	

glucose).....	37
圖 3-5 溶氧量控制下之批次發酵裝置圖.....	38
圖 3-6 提供光源下之搖瓶培養裝置圖.....	38
圖 3-7 探討光強度影響之批次發酵裝置圖.....	39
圖 3-8 提供三盞 LED 光源下之連續饋料批次發酵裝置圖.....	39
圖 4-1 脂肪酸分析圖: (a) <i>Rhodotorula glutinis</i> 油脂之脂肪酸成分; (b) 定性用脂肪酸標準品.....	41
圖 4-2 Time course 對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	43
圖 4-3 不同碳源對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	45
圖 4-4 不同起始 glucose 濃度對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	47
圖 4-5 不同起始氮源濃度對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	49
圖 4-6 左:容積為 250 ml 平底的搖瓶;右:容積為 250 ml 有檔板的搖瓶.....	50
圖 4-7 不同培養體積對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	51
圖 4-8 不同培養轉速對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	53
圖 4-9 兩階段轉速改變對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	55
圖 4-10 不同培養溫度對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	57
圖 4-11 光照強度對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	59
圖 4-12 起始葡萄糖濃度為 60 g/l 之批次發酵策略下, <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	61

圖 4-13 起始葡萄糖濃度為 100 g/l 之批次發酵策略下, <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	61
圖 4-14 起始葡萄糖濃度為 140 g/l 之批次發酵策略下, <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	62
圖 4-15 比較起始葡萄糖濃度為 60 g/l、100 g/l、140 g/l 之批次發酵策略下, <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	62
圖 4-16 控制溶氧量在 $25 \pm 10\%$ 、 $60 \pm 10\%$ 之批次發酵 DO (%) 變化情形.....	65
圖 4-17 控制溶氧量在 $25 \pm 10\%$ 之批次發酵策略下, <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	65
圖 4-18 控制溶氧量在 $60 \pm 10\%$ 之批次發酵策略下, <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	66
圖 4-19 比較控制溶氧量在 $25 \pm 10\%$ 、 $60 \pm 10\%$ 之批次發酵策略下, <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	66
圖 4-20 控制溶氧量於 72 小時前為 $60 \pm 10\%$, 72 小時後為 $25 \pm 10\%$ 之兩階段批次發酵策略下, <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	68
圖 4-21 提供二盞 LED 燈(光強度為 $2566.6 \mu\text{mole/s/m}^2$) 之批次發酵策略下, <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	70
圖 4-22 提供三盞 LED 燈(光強度為 $3849.9 \mu\text{mole/s/m}^2$) 之批次發酵策略下, <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	70

圖 4-23 比較無光源、提供二盞 LED 燈(光強度為 $2566.6 \mu\text{mole/s/m}^2$)、三盞 LED 燈(光強度為 $3849.9 \mu\text{mole/s/m}^2$)之批次發酵策略下， <i>R. glutinis</i> 生長之變化.....	71
圖 4-24 比較無光源、提供二盞 LED 燈(光強度為 $2566.6 \mu\text{mole/s/m}^2$)、三盞 LED 燈(光強度為 $3849.9 \mu\text{mole/s/m}^2$)之批次發酵策略下， <i>R. glutinis</i> 累積油脂之變化.....	71
圖 4-25 控制葡萄糖濃度在 $10 \pm 2 \text{ g/l}$ 之饋料批次發酵策略下， <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	74
圖 4-26 控制葡萄糖濃度在 $20 \pm 4 \text{ g/l}$ 之饋料批次發酵策略下， <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	74
圖 4-27 控制葡萄糖濃度在 $30 \pm 5 \text{ g/l}$ 之饋料批次發酵策略下， <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	75
圖 4-28 比較控制葡萄糖濃度在 $10 \pm 2 \text{ g/l}$ 、 $20 \pm 4 \text{ g/l}$ 、 $30 \pm 5 \text{ g/l}$ 之饋料批次發酵策略下， <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	75
圖 4-29 兩階段溶氧搭配單次饋料批次發酵策略下， <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	78
圖 4-30 比較兩階段溶氧批次發酵策略與兩階段溶氧搭配單次饋料批次發酵策略下， <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之變化.....	78
圖 4-31 提供三盞 LED 燈(光強度為 $3849.9 \mu\text{mole/s/m}^2$)搭配連續饋料批次控制	

葡萄糖濃度在 30 ± 2 g/l 發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化.81

圖 4-32 比較提供三盞 LED 燈(光強度為 $3849.9 \mu\text{mole/s/m}^2$)之批次發酵策略與

三盞 LED 燈(光強度為 $3849.9 \mu\text{mole/s/m}^2$)搭配連續饋料批次控制葡萄糖濃

度在 30 ± 2 g/l 發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化.....81

表目錄

表 2-1	Oil content of some microorganisms.....	5
表 2-2	Lipid composition of some microorganisms.....	5
表 3-1	實驗藥品清單.....	21
表 3-2	實驗儀器清單.....	26
表 3-3	種子培養基.....	27
表 3-4	發酵培養基.....	27
表 4-1	不同培養時間對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	43
表 4-2	不同培養時間之脂肪酸組成表.....	43
表 4-3	不同碳源對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	45
表 4-4	不同碳源之脂肪酸組成表.....	45
表 4-5	不同起始 glucose 濃度對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	47
表 4-6	不同起始 glucose 濃度之脂肪酸組成表.....	47
表 4-7	不同起始氮源濃度對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	49
表 4-8	不同起始氮源濃度之脂肪酸組成表.....	49
表 4-9	不同培養體積對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	51
表 4-10	不同培養體積之脂肪酸組成表.....	51
表 4-11	不同培養轉速對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	53

表 4-12	不同培養轉速之脂肪酸組成表.....	53
表 4-13	兩階段轉速改變對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	55
表 4-14	兩階段轉速改變之脂肪酸組成表.....	55
表 4-15	不同培養溫度對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	57
表 4-16	不同培養溫度之脂肪酸組成表.....	57
表 4-17	光照強度對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	59
表 4-18	光照強度之脂肪酸組成表.....	59
表 4-19	不同起始 glucose 濃度於批次發酵策略下之動力學參數.....	63
表 4-20	不同起始 glucose 濃度之脂肪酸組成表.....	63
表 4-21	控制溶氧量於批次發酵策略下之動力學參數.....	68
表 4-22	控制溶氧量之脂肪酸組成表.....	68
表 4-23	探討光強度於批次發酵策略下之動力學參數.....	72
表 4-24	探討光強度之脂肪酸組成表.....	72
表 4-25	控制 glucose 濃度於饋料批次發酵策略下之動力學參數.....	76
表 4-26	控制 glucose 濃度之脂肪酸組成表.....	76
表 4-27	兩階段溶氧批次發酵策略與兩階段溶氧搭配單次饋料批次發酵策略下 之動力學參數.....	79
表 4-28	兩階段溶氧批次發酵策略與兩階段溶氧搭配單次饋料批次發酵策略之 脂肪酸組成表.....	79

表 4-29	提供三盞 LED 燈之批次發酵策略與提供三盞 LED 燈搭配連續饋料批次 發酵策略下之動力學參數.....	82
表 4-30	提供三盞 LED 燈之批次發酵策略與提供三盞 LED 燈搭配連續饋料批次 發酵策略下之脂肪酸組成表.....	82
表 4-31	各實驗之動力學參數整理.....	85
表 4-32	各實驗之脂肪酸組成整理.....	86
表 4-33	<i>Rhodotorula glutinis</i> 文獻與本研究成果比較(I).....	87
表 4-34	<i>Rhodotorula glutinis</i> 文獻與本研究成果比較(II).....	88

第一章 緒論

以往因為人類能量需求小，相對天然資源又豐富，所以長久以來大量享受廉價的天然能源，而石油形成之過程需要幾千萬的時間才能完成，依照化石燃料可開採年數及人類使用的速率，顯而易見，石油的消耗量每十年增一倍，在西元 1950 年，世界石油儲藏量，幾乎可供 100 年使用。然而，自然資源有限，如果不能生生不息，終有耗盡的一天。依現今的估計，在各項初級能源中，石油可用 40 年、天然氣可用 60 年、煤炭可用 200 年、鈾可用 70 年。未雨綢繆，尋求資源的永續供給，並減少對環境的衝擊，尋找替代燃料(如生質柴油、生質酒精等)及再生能源(包括太陽能、地熱、風能、海洋能及生質能)乃成為目前的當務之急。

雖然生質柴油已被視為相當高開發價值的替代能源之一，但是高的原料成本及與民爭食等問題仍限制其發展，而對微生物油脂的研究，正巧提供了更佳穩定、不受四季影響且比起動植物細胞所榨取的油脂較為容易控制的原料來源。妥善利用細胞篩選的方式來挑出較高含油量的菌株，再透過遺傳與代謝工程(如 DNA 重組、定點突變等)，來提高總脂質的含量與改變脂質組成以適合生質柴油的生產，另外還可利用程序工程的概念，如選定不同的培養模式及策略，如批次發酵、半連續式發酵、連續式發酵等，來提高目標產物的產率、產量或油脂含量，加上有些微生物能利用工業或農業廢棄物當營養源，能有效降低成本，因此運用微生物來生產油脂，作為替代性原料的來源，將是未來發展的一大趨勢。

第二章 文獻回顧

2.1 生質柴油介紹

生質柴油的發展可追溯到十九世紀，當時 Rudolf Diesel 發明設計出柴油引擎，並於 1900 年巴黎世界博覽會發表以花生油驅動的柴油引擎(Tickell, 2000)，提倡植物油與石油為同等重要燃料的構想，此為生質柴油之起源。

他認為若能大量使用農作物所提煉出來的油脂做為燃料，將有助於鄉村經濟的發展。然而，生質柴油的理念卻因為無法對石化燃料探勘與開採技術迅速發展所帶來低價化石燃料(fossil fuel)的競爭，因此失去了舞台。直到今日，由於石油價格不穩定與環保訴求下，使得生質柴油作為替代能源之趨勢也越來越受到肯定。(謝志強，2007)

生質柴油(Biodiesel)又稱生物柴油，是一種潔淨之替代燃料，因不含石化成分，且可以獨立或與石化柴油混合使用於既有或稍作少許修改之柴油引擎，是一種使用方便、無毒、生物可分解之燃料。生產生質柴油最常見的方法係以可再生的生質能為原料與醇類混合，經過轉脂化反應後所形成的一種直鏈烷基酯燃料(脂肪酸甲酯或脂肪酸乙酯)。

可再生的生質能來源以未加工過或使用過之植物油，如：大豆油(soybean oil)、棕櫚油(palm oil)、油菜籽油(rape seed oil)、橄欖油(olive oil)、海藻(algae)、向日葵油(sunflower oil)等或動物脂肪為主。然而，為了種植這些富含油脂的農作物，就必須利用到廣大的耕種面積和農業肥料，同樣地，欲從動物身上取得油脂

前，需要提供飼料來飼養牠們，使得生質柴油在商業化、經濟效應上受到許多限制(Altolin G. et al., 2002)，根據估算，如用植物油為原料來生產生質柴油，其植物油成本將占生產總成本的 70~85%(Miao Xiaoling et al., 2006)，此舉往往造成生物柴油生產將競爭食用油脂，從而導致糧食價格上漲、與民爭食、與糧爭地等問題，包括以餐飲廢棄油為原料，也存在油料穩定度不足和運輸困難等問題，由此可知，尋找一種大量且廉價的原料成為左右生質柴油產業化的關鍵。

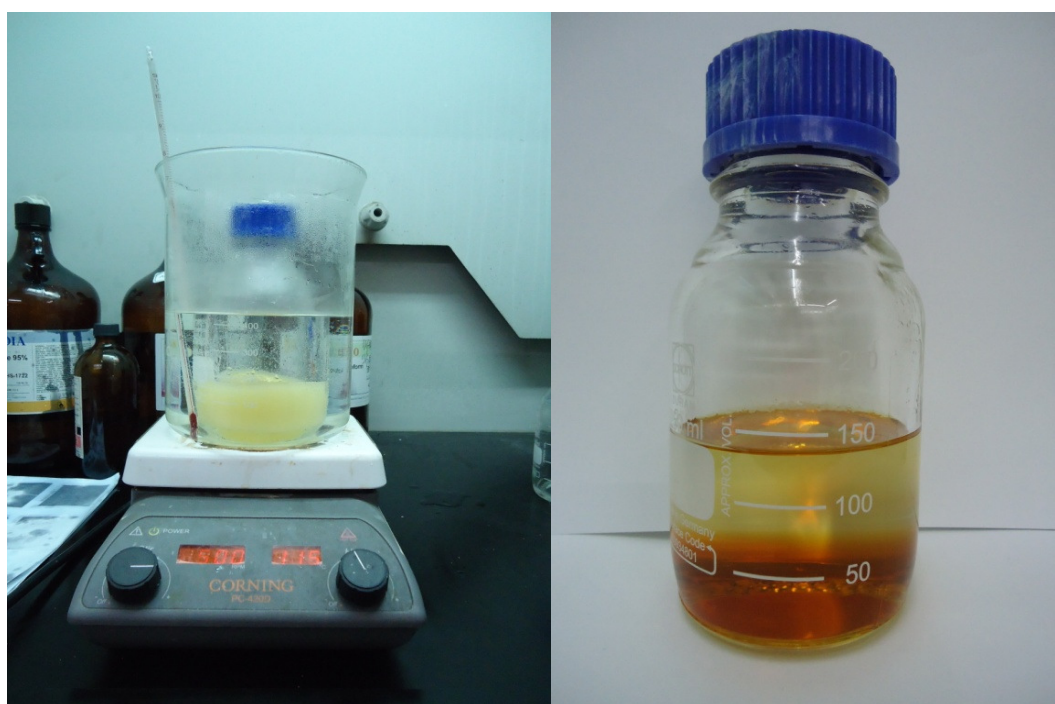


圖 2-1 實驗室利用沙拉油進行鹼催化轉酯化反應生產，右圖上層為轉脂化之生質柴油，下層為粗製甘油。

2.2 微生物油脂介紹

微生物油脂又稱單細胞油脂，利用其來生產生質柴油，已引起世界各國高度的重視。雖然，有很多物種都具備累積油脂的能力，如微藻、細菌、真菌和酵母菌(Xin Meng et al., 2009) (表 2-1)，但並不是所有的油脂都適用於生產生質柴油，只有皂化脂類和游離脂肪酸才能轉脂化成烷基脂(Vicente G et al., 2009)。根據報導指出，多數的含油酵母菌和微藻在成長過程中所累積的油脂，類似植物油(Aggelis G. et al., 1997)，因此是一種相當適合作為生質柴油使用的油料選項。

近年來，更有學者對於能累積疏水性油脂的微生物進行大量的研究，用來生產微生物油脂，特別是將其應用於製造生質柴油上。在微生物中，其累積油脂的程度或範圍，是受到遺傳基因所決定的，然而，最佳累積油脂的含量，更可以因為不同的物種或不同的菌株而有所差異。根據不同的微生物以不同的培養條件，如溫度、pH 值、培養時間等，其油脂含量與成分也就不同(Xin Meng et al., 2009) (表 2-2)。

透過微生物發酵生產微生物油脂，可為生物柴油的製備提供更加廉價而廣泛的原料，而且微生物具有細胞增殖快、生產週期短、生長所需的原料豐富和價格便宜等優點，一些產油微生物還可以轉化五碳糖為油脂，這一特性尤其適用對木質纖維素，可再生生物質資源水解糖化液的利用，因此，利用微生物發酵生產油脂作為製備生質柴油的原料，在未來生物柴油產業中將發揮重要的作用(劉宏娟，2008)。

表 2-1 Oil content of some microorganisms (Xin 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 2-2 Lipid composition of some microorganisms (Xin 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	-

2.3 油脂性微生物的介紹

在適宜的條件下，某些微生物產生並儲存的油脂占其生物總量的 20% 以上，具有此種特徵的菌種，被稱為油脂性微生物(Ratledge C. et al., 2002)。已知細菌、酵母菌、真菌、微藻中都有能生產油脂的菌株。

2.3.1 微藻

微藻可視為受日光驅動的細胞工廠(圖 2-2)，透過光合作用能將大氣中的二氧化碳固定成具有潛力的生質燃料，微藻可以提供幾種不同類型的可再生生物燃料，如利用厭氧分解菌可將藻類細胞分解進而產生甲烷，而藻類細胞所累積的油脂可作為生質柴油的原料，也可以透過藻類行光合作用的方式來產生生質氫氣。已有文獻證實，大部分的微藻細胞中富含 ω 3、 ω 6 脂肪酸與人體所必需的胺基酸，如白氨酸、異亮氨酸、纈氨酸等(Guil-Guerrero JL. et al., 2004)。幾乎所有的微藻都以三酸甘油脂(>80%)的形式去累積油脂，其脂肪酸的成分以 C16 和 C18， Δ^9 、 Δ^{12} 、 Δ^{15} 去飽和度所構成，類似植物油的成分，因此為良好的生質柴油來源。

微藻成長迅速且富含油脂，達雙倍成長量僅需 24 小時，其平均脂質的含量界於 1% 到 70% 之間，但在特定的條件下，可獲得 90% 的脂質。現今微藻的年產值已達 5000 噸，其產生的營業額估計可達每年 1.25×10^9 美金。由於微藻具有較高的光合效率、較高生質能的產生且比起能源作物有較快的生長速率，使得微藻被視為良好的生產微生物油脂的菌株之一。

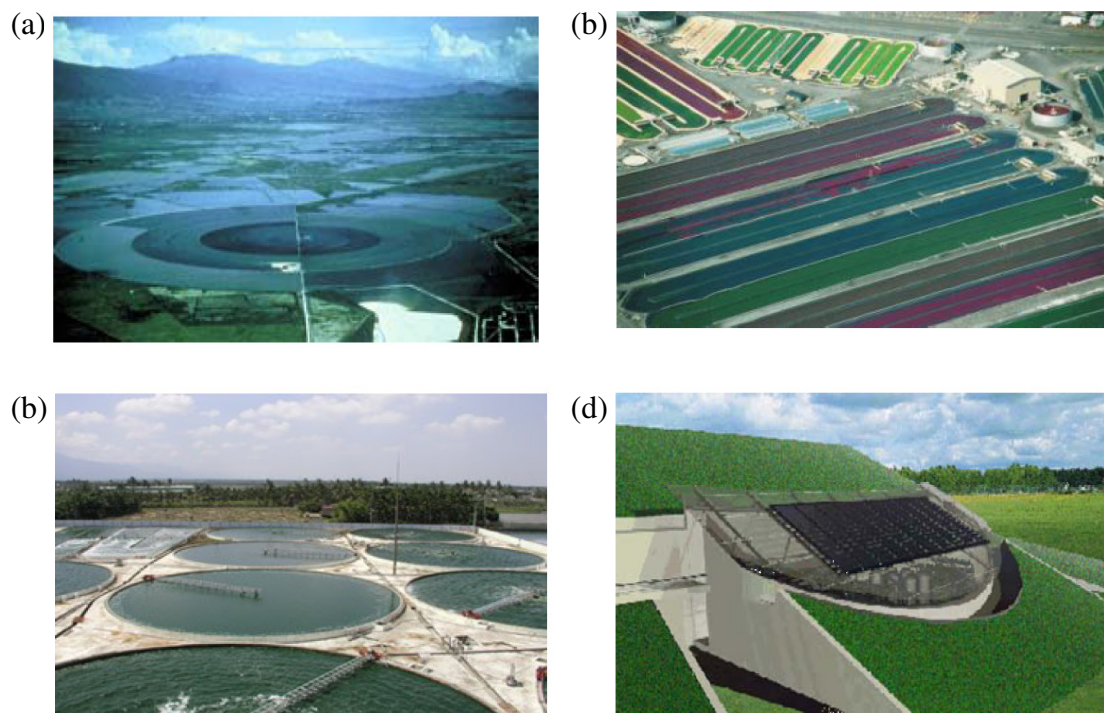


圖 2-2 藻類開放式系統培養示意圖 (葉俊良, 2006)

(a) 大型淺池 (b) 跑道型培養池 (C) 圓形培養池 (d) 斜板型培養池

2.3.2 細菌

雖然微藻是一種高油脂含量的微生物，但是相較於細菌、真菌、酵母菌，培養微藻必需利用到較大、較廣的土地面積，且發酵周期比細菌長(圖 2-2)。如表 2-2 所示，幾乎所有的細菌所累積的油脂含量較微藻低，平均的油脂含量大約在 20~40%之間，如 *Arthrobacter sp.* 和 *Acinetobacter calcoaceticus* 的油脂含量分別為 40%和 38%。細菌利於生產微生物油脂的優勢，主要在於細菌的成長速率最快，達最大菌數量只需要 12~24 小時且易於培養。

作為替代的方案，儲存並累積油脂的細菌，特別以放線菌家族較有利於使用，在生長受到限制且碳源為葡萄糖的條件下，放線菌能累積約 70%的脂肪酸於細胞內且以三酸甘油脂的形式作儲存。然而，大多數的細菌普遍都不是油脂的

生產者，只有很少量的細菌能累積複雜的類脂物，如聚羥基烷酸脂。由於油脂性細菌所產生的類脂物是在外膜上所形成的，導致萃取困難，使得油脂性細菌較少應用於生產微生物油脂的製程上。

2.3.3 酵母菌與真菌

自從西元 1980 年以來，酵母菌和真菌(主要是黴菌)被視為最有效的產油性微生物。一些酵母菌菌種，如 *Rhodosporidium sp.*、*Rhodotorula sp.*、*Lipomyces sp.* 等可以累積高達 70% 的細胞內油脂。根據文獻指出，油脂性酵母菌 *Cryptococcus curvatus* 成長在氮源受到限制的條件下，能有效的累積並儲存油脂達 60% 以上，這些脂質中約有 90% 以上是以三酸甘油脂的形式所組成，其中飽和脂肪酸占 44%，且類似植物油的成分。

油脂酵母菌和黴菌所累積的油脂中，也富含不飽和脂肪酸的成分，通常是以油酸(C18:1)、亞油酸(C18:2)、棕櫚酸(C16:0)或棕櫚油酸(C16:1)為主(表 2-2)，其中不飽和脂肪酸所占的含量較高。根據文獻指出，著名的產油酵母菌株 *Rhodosporidium toruloides Y4* 和 *R. toruloides CBS 14* 所累積的長鏈脂肪酸主要也是由 C16 和 C18 所構成(Evan CT. et al., 1984)。最近，也有文獻證實利用搖瓶進行連續批次的方式來培養 *Rhodosporidium toruloides Y4*，在培養 25 天之後，菌體濃度和細胞脂質含量分別可達到 151.5 g/l 和 48.0%(w/w)(Li Yonghong. et al., 2007)(圖 2-3)。絲狀真菌-Mortierella alliacea Strain YN-15 在 50-L 的發酵槽中培養至第 7 天時，菌數量和總脂質量分別可達到 46.1 g/l 和 19.5 g/l，其中有 7.1 g/l

是以花生四烯酸(ARA,C20:4n-6)的形式來做累積(Takeno Seiki. et al., 2005)(圖 2-3)。依據這些數據顯示，油酯酵母菌與真菌是很有潛力作為生質柴油的替代性原料之來源。



圖 2-3 左:*Rhodotorula glutinis*之搖瓶批次培養裝置圖；右:*Rhodotorula glutinis*之 5L 發酵槽批次培養裝置圖

2.4 菌種選擇

在油脂性微生物中，酵母菌是有優勢於細菌、真菌及微藻的。這是由於酵母菌屬於單細胞生物，相對有較高的成長速率，且具備迅速累積油脂的能力，還可以利用價格較低廉的培養基，如營養物質從農業或工業殘餘物中所取得等(Xue F et al., 2006)。

2.4.1 菌種介紹—*Rhodotorula glutinis*

Rhodotorula glutinis 屬於紅酵母菌的成員之一，也屬於腐生菌的一類，抗逆性較強，廣泛分布於各種生態環境中。從陸地到海洋、赤道到兩極均有紅酵母的

存在。在陸地，紅酵母可以存在於各種底物上，如土壤、糞肥、動植物體及一些低等生物中；在海洋，紅酵母也是大量存在的酵母菌種類。此外，其他水域如江河、湖泊均有紅酵母存在。

Rhodotorula glutinis 細胞的形態呈圓形或卵圓形，行無性多邊出芽繁殖，菌落為紅色，但無酒精發酵的能力，宜生長於 20~30℃ 偏酸性的環境中(圖 2-4)。根據文獻指出，*Rhodotorula glutinis* 能累積高達 72% 以上的油脂，也是生產 β -carotene 的菌株之一，其中 β -carotene 具有抗癌與抗氧化等功效，能抑制人體和動物中單線氧的生成，是近年來相當熱門的健康食品。

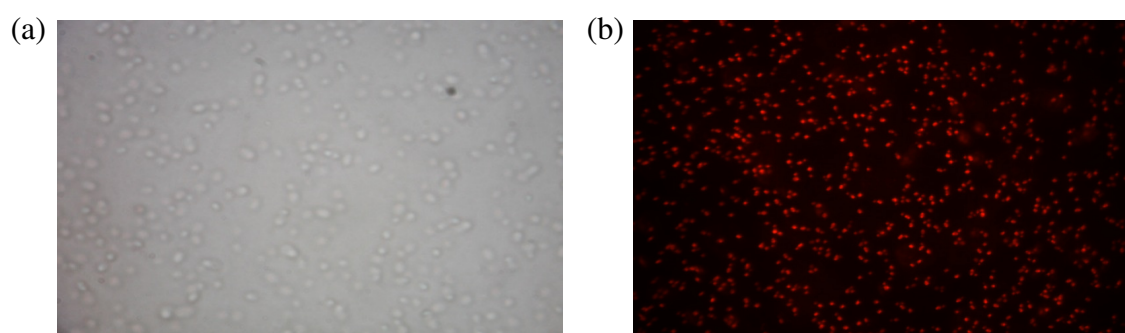


圖 2-4 (a) 為用光學顯微鏡,再放 400 倍下所觀察到 *Rhodotorula glutinis* 的細胞型態，呈圓形或卵圓形；(b) 為用倒立式螢光顯微鏡(添加 Nile red)，在 400 倍所觀察到 *Rhodotorula glutinis* 的細胞顏色為紅色

2.5 微生物產油機制

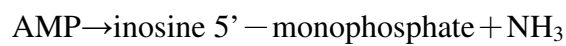
一般而言，油質性微生物產油的要素可分為兩部分(C. Ratledge, 2004):

- I. 能連續地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

- I. 當氮源用盡，細胞內 AMP deaminase 活性上升，約為氮源尚未用盡時的五倍。
- II. 隨著 AMP deaminase 活性上升，細胞內與粒線體中的 AMP 濃度下降。



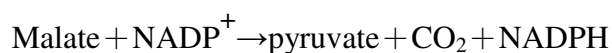
- III. 由於 AMP 濃度下降，isocitrate dehydrogenase 也跟著停止運作。
- IV. isocitrate dehydrogenase 的停止，造成 isocitrate 無法被代謝而且藉著 Aconitase 與 citric acid 達成平衡。
- V. 因此 citrate 得以累積於粒線體內，而足夠的 citrate 進入細胞質後，被

ATP:citrate lyase 切斷產生了 acetyl-CoA 和 oxaloacetate。



NADPH

經由 malic enzyme 可得 NADPH:



以上文字敘述可由圖 2-5 表示：

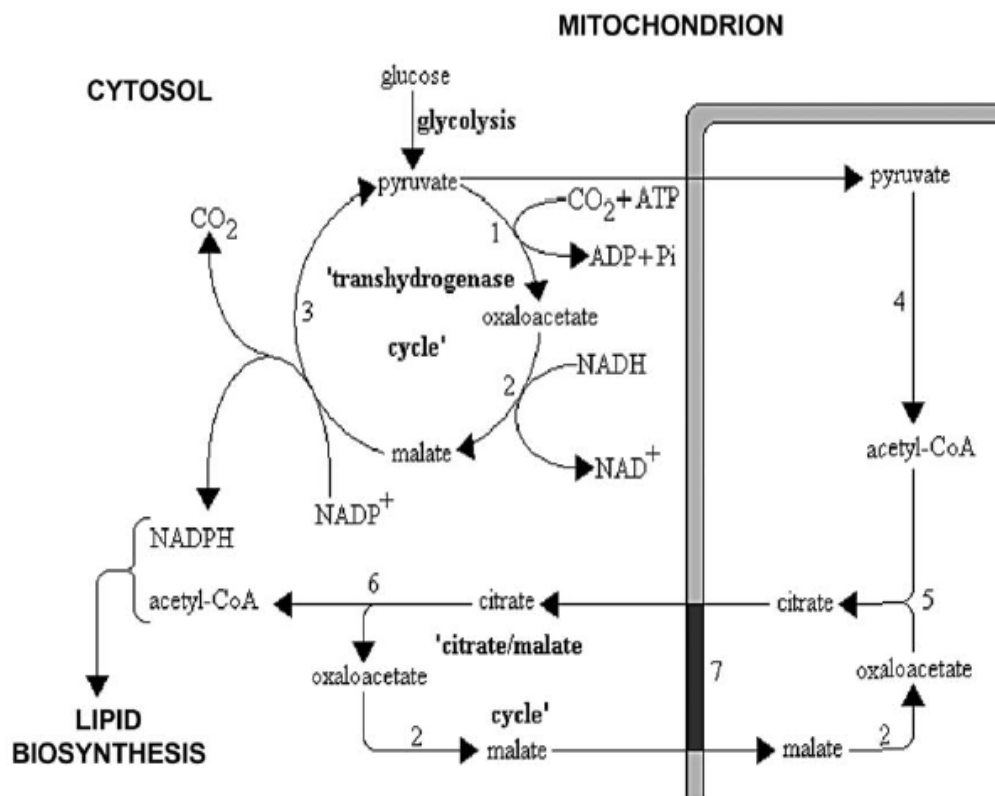


圖2-5 A scheme to show how the citrate/malate cycle and the cytosolic 'transhydrogenase' cycle could provide sufficient precursors of acetyl-CoA and NADPH for lipogenesis in oleaginous microorganisms. Enzymes:1,pyruvate decarboxylase; 2, malate dehydrogenase; 3, malic enzyme; 4, pyruvate dehydrogenase; 5, citrate synthase; 6, ATP:citrate lyase; 7, citrate/malate translocase. Net carbon balance: pyruvate \rightarrow acetyl-CoA + CO₂. Net reaction for NADPH production: NADPH+NADP⁺+ATP \rightarrow NAD⁺+NADPH+P_i. The transhydrogenase cycle can operate independently of the carbon flux from citrate in the mitochondrion to acetyl-CoA in the cytosol and consequently can provide all the the NADPH needed for both fatty acid biosynthesis and fatty acid desaturation and elongation reactions. (Colin Ratledge,2004)

綜合以上，可由圖 2-6 表示整個油脂（脂肪酸）的累積機制：

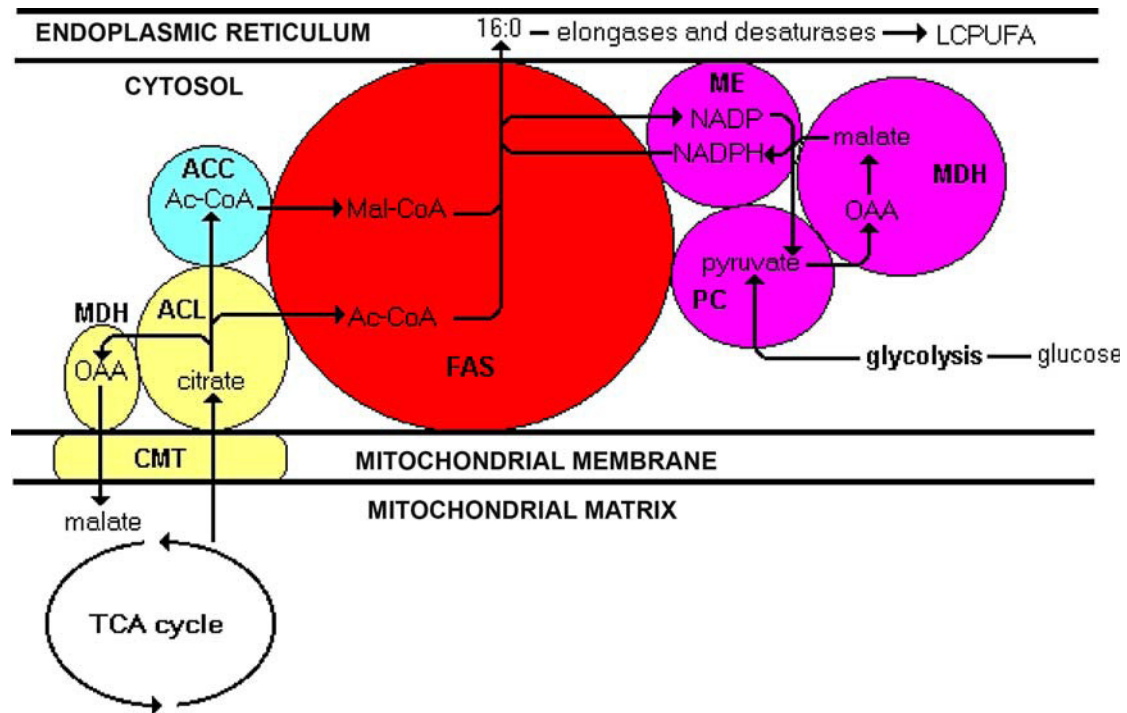


圖2-6 A diagram to show the organisation of a hypothesised lipogenic metabolon. The flux of carbon from the mitochondrion, via citrate efflux and acetyl-CoA formation in the cytosol, thence into fatty acids and finally into chain PUFAs (LCPUFA) occurring in the membranes of the endoplasmic reticulum, is shown by the continuous lines. The system uses pyruvate (from glycolysis) as the provider of intramitochondrial acetyl-CoA and for citric acid production as is shown in 圖2-2 but which is not repeated here for clarity. OAA:oxaloacetate; AC-CoA:acetyl-CoA; Mal-CoA: malonyl-CoA; FAS: fatty acid synthase; ACL:ATP:citrate lyase; ACC: acetyl-CoA carboxylase; CMT: citrate/malate translocase; ME: malic enzyme; PC: pyruvate carboxylase; MDH: malate dehydrogenase. The 'yellow' enzymes from the citrate/malate cycle while the 'purple'enzymes represent the cytosolic transhydrogenase cycle. (Colin Ratledge, 2004)

2.6 影響微生物油脂產量因子

微生物累積油脂的生理機制，已獲得良好的研究，根據文獻指出，微生物必須在碳源(葡萄糖、甘油、糖蜜等)過剩相對氮源(peptone、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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，微生物成長與累積油脂受到培養基中碳氮比(carbon-to-nitrogen ratio)和其他因素，如溫度、pH 值、溶氧量、培養時間等影響。

2.6.1 物理因子

2.6.1.1 培養時間

隨著培養時間的進行，油脂性微生物合成脂質可分為兩階段:第一階段，細胞生長期(Growth phase)，此時營養充分，微生物的菌體量與油脂同時增加中；第二階段為脂肪合成期(Production Phase)，若碳源仍充足但其他養分耗盡，脂肪酸持續累積於菌體內，若碳源與其他養分皆耗盡時，某些微生物會自行分解內脂質作為碳源來使用。

2.6.1.2 溫度

許多研究皆發現在低溫時，微生物具有較高不飽和脂肪酸之生產能力。推測在低溫的環境下，微生物為了要適應低溫，而增加多元不飽和脂肪酸之生成。根據文獻指出，在低溫時有較多氧溶於培養基中，而氧氣是脂肪酸進行去飽和酵素作用時所必需，故可能是溫度的不同造成溶氧不同而影響菌體生長以及代謝。

溫度是影響微生物生長、脂質組成及多元不飽和脂肪酸形成的重要因子。提

高培養溫度可促進細胞生長速率，因而提高脂肪酸累積量，但溫度高於 35°C 時，不利 *Rhodotorula glutinis* 的生長，而溫度低於 20°C，菌體生長速率非常遲緩，因此必需視菌體最佳的培養溫度而定。

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

2.6.1.4 溶氧量

發酵液中的溶氧濃度(Dissolved Oxygen, 簡稱 DO)對微生物的生長和產物的形成有著重要的影響。在發酵的過程中，必須供給適量的無菌空氣，菌體才能繁殖和累積所需的代謝產物。不同菌種及不同發酵階段的菌體之需氧量是不同的，發酵液的 DO 值直接影響微生物之酵素的活性、代謝途徑及產物產量。發酵過程中，氧的質傳速率主要受發酵液中溶解氧的濃度和傳遞阻力等影響。研究溶氧量對發酵的影響及控制對提高生產效率，改善產品產質等都有重要的意義(Zhang Ping et al., 2007)。

Rhodotorula glutinis 屬於專性需氧菌，在其成長的階段中，提高發酵液中的溶氧量，有助於提高 *Rhodotorula glutinis* 的生長速率，根據文獻指出，*Rhodotorula glutinis* 在含氧量高的空氣下，進行饋料式發酵，培養至 84 小時，菌體濃度能從

100~110 g/l 大幅提升到 185 g/l(Pan J.G. et al., 1986)。將溶氧濃度從 25 μm 提高到 234 μm 對 *Rhodotorula gracilis* 累積脂質方面作探討，發現脂質的含量並無明顯的差異，反倒是影響了脂質的不飽和度(S. Y. Choi. et al., 1982)。

2.6.1.5 光

光是植物維持生命所必需，直接影響了植物的生長與發育，這是一般我們所熟悉之光的重要性，不只是植物，也有文獻指出光會影響藻類的代謝，例如光會影響 *Spirulina platensis* 代謝類胡蘿蔔素、藻藍素及葉綠素等(Danesi E.D.G. et al., 2004)。

近年來光對於真菌的影響也開始受到重視，最著名的例子就是由 *Aspergillus nidulans* 中發現含有光敏素(phytochrome)會對紅光及遠紅光產生反應，在接受紅光時它會行無性生殖，而當接受到遠紅光時則會行有性生殖(Anne Blumenstein et al.,2005)。而另一個著名的例子就是由 *Neurospora crassa* 中發現含有藍光的接受器 White Collar 1(WC-1)及 VIVID，主要的功能是調節體內蛋白質的合成路徑，使得照光及黑暗中分別走不同的途徑(Borkovich K.A. et al., 2004)。

對於某些含有光接受器的真菌，如 *Penicillium brevicompactum*、*Aspergillus nidulans* 等來說，雖無法像植物能將光能直接轉變成可供利用的能源，但能透過照光之方式，去改變體內蛋白質合成的途徑，因而間接地影響到菌體的生長與代謝產物的生成。

2.6.2 化學因子

2.6.2.1 碳源和氮源

影響微生物生長最重要的因素莫過於培養基的組成，特別是基質組成裡比重很大的碳源與氮源，其影響微生物生理狀態的程度更加直接。碳源和氮源是微生物合成細胞時所需的成分，但在碳源足夠而氮源欠缺的情形下，微生物不再增殖，而是將所吸收的碳源轉變為脂質。因此，選擇適當的碳源與氮源來培養油脂性酵母菌是使其達到高產油量的重要關鍵。培養基中之碳氮比越高時，有利於多元不飽和脂肪酸的生產；而碳氮比較低時，只能促進較短鏈或較少含量的不飽和雙鍵脂肪酸產生。

2.6.2.1.1 碳源

碳源為供應細胞生長的能量以及骨架形成的必需來源，並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，因為濃度高時其培養基的滲透壓也較高所致。根據文獻指出，有學者選擇利用生質柴油工廠的副產物粗乾油、木質纖維素之水解糖化液作碳源，對 *Rhodotorula glutinis* 生產油脂及類葫蘆波素來進行探討，以有效降低生產成本和解決與民爭食等問題(Saengea C. et al., 2011)。

2.6.2.1.2 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氣

化銨、磷酸二氫銨、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。

2.6.2.2 無機鹽和微量元素

磷在細胞能量轉移方面扮演了重要的角色，磷脂質與核酸的合成也需要有磷的存在，因 ω -3 系多元不飽和脂肪酸主要存在細胞的極性之脂質中，如磷脂質，因此磷也會影響多元不飽和脂肪酸的合成。根據文獻指出，培養基中的碳磷比 (C/P)，會直接影響到 *Rhodospiridium toruloides* Y4 累積脂質的含量(Siguo 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；矽是為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。

2.7 微生物油脂發酵策略介紹

2.7.1 批次微生物油脂發酵

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。

2.7.2 饋料批次微生物油脂發酵

饋料發酵是指在批次發酵過程中，間歇或連續地加入培養基的方法，又稱半連續發酵(semi-fed-batch)，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。

2.7.3 兩階段培養策略

透過單一變因之探討後，再進化到兩階段培養模式。兩階段培養策略在於第一階段:細胞生長期(Growth phase)時，提供細胞成長所適宜的環境，如溶氧量、溫度、pH 值等，以大幅縮短菌數量達最大值之時間，穩定生長後，即進入第二階段:脂肪合成期(Production Phase)，利用饋料或改變操作參數，如碳源濃度、溶氧量、溫度等方法，來有效累積微生物油脂。

根據文獻指出，利用兩階段策略培養 *Rhodotorula glutinis* 與其它不同的發酵方法，如同一條件下持續培養 *Rhodotorula glutinis* 作比較，發現兩階段培養模式能縮短 1/4 到 1/3 的發酵時間，油脂累積量能增加 20~30%，且降低了 60~70% 的能源花費，使得此策略在經濟上是可行地，能應用於工業製程中(Hua Ye et al., 2010)。

第三章 材料與方法

3.1 實驗材料

3.1.1 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，由國立虎尾科大生物科技系張耀南教授所提供。



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
糖蜜	Molasses	味丹
甘油	Glycerol	SHOWA
水溶性澱粉	Starch soluble	Riedel-deHaën
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 dihydrogenphosphate	SHOWA
氯化鈣	Calcium dichloride dehydrate	聯工化學試藥
氯化鈉	Sodium chloride	SHOWA
鹽酸	Hydrochloric acid	Scharlau
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	SHOWA
氫氧化鉀	Potassium hydroxide	SHOWA
甲醇	Methanol	ECHO
氯仿	Chloroform	ECHO
三氯化硼	Boron trifluoride diethyl etherate, 98%	Alfa Aesar
正己烷	n-Hexane, 95%	TEDIA
肉豆蔻酸甲脂	Methyl tetradecanoate, 99%	Alfa Aesar
棕櫚酸甲酯	Methyl palmitate, 97%	Alfa Aesar
棕櫚油酸甲酯	Palmitoleic acid methyl ester	MP Biomedicals TM

硬脂酸甲酯	Methyl stearate, 99%	Alfa Aesar
-------	----------------------	------------

(接續前頁)

油酸甲酯	Methyl oleate	ACROS
亞麻油酸甲酯	Linoleic acid methyl ester	MP Biomedicals™
次亞麻油酸甲酯	Linolenic acid methyl ester	MP Biomedicals™
瓊脂	Agar	DIFCO
YM BROTH	Yeast Malt Broth	DIFCO BD

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
微電腦蒸餾水製造機	FISTREEM	WSC044
超純水製造機	Millipore	Simplicity
磁石攪拌加熱器	ChromTech	MS-3250B
pH 計	Lutron	PH-206
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
5 公升攪拌式發酵槽	頂生	

試管震盪器	IKA	MS1 minishaker
微電腦分光光度計	Thermo	GENESYS 10UV
高速中型離心機	Hettich	Universal-32R
葡萄糖分析儀	YSI	2300STAT
冷凍乾燥機	PAN CHUM	CT-series
(接續前頁)		
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
桌上型微量離心機	HSIANGTAI	MCD-2000
氣相層析儀	Thermo	Focus GC
T5 日光燈	T5-8W/D 110V	SUN
T5 日光燈座		SUN
LED 燈	MR16-7W	
光度計	LI-COR	LI-250A

3.3 分析方法

3.3.1 光照強度測定方法

將培養箱與 5-L 發酵槽受光表面分成六部分，分別是左上、左中、左下、右上、右中、右下部分，此六點所測得之光照強度，取平均值，即為培養箱與 5-L 發酵槽之光照強度，單位為 $\mu\text{mole photon/s} \cdot \text{m}^2$ 。

3.3.2 菌體濃度分析方法

將菌液稀釋至適當的濃度下，利用分光光度計在波長 660 nm 下測量其光學

密度，若 O.D. 值大於 1 時則加入蒸餾水稀釋至 1 以下。之後取 20 ml 菌液，在轉速 9,000 rpm 下離心 10 min，去除上清液取得菌體後，再加入等體積的蒸餾水，充分震盪使菌體與蒸餾水混合，洗去雜質後再離心一次，收取下層菌體，放入 60°C 烘箱烘乾 72 小時，測得菌體乾重(Dry cell weight, DCW)。依各個時間點所量測的 DCW 和 O.D. 值作圖，即可獲得檢量線：

$$\text{Concentration(g DCW/l)}=0.6525 \times \text{O.D.}_{660 \text{ nm}}+0.0434$$

(附錄 A)

3.3.3 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 9,000 rpm 下離心 10 min，分離菌體和上清液。取上清液並利用 YSI 2300STAT Glucose analyzer 來量測。

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，並以超音波破碎機破碎菌細胞(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 5000 rpm 離心 10 min。收集上層萃取液於已秤重之鋁皿，殘留之細胞再次加入 3 ml 甲醇/氯仿溶液萃取至無色，將所有萃取液放入 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)，將脂質的含量(%，w/w)乘上菌體濃度(g/l)，即可計算出總脂質的濃度(g/l)。

3.3.5 脂質成分分析方法

秤取冷凍乾燥後的菌體 50 mg，加入 4ml 0.5N KOH/MeOH 以試管震盪器混合均勻，並以超音波破碎機破碎菌細胞(功率 5，作用時間 2 min)，然後靜置萃取 1 hr，取上層 KOH/MeOH 萃取液，以 100°C 水浴 15 min 行皂化反應。待試管冷卻到室溫，加入 4ml 0.7N HCl/MeOH 及 5ml 10% BF₃/MeOH，在 100°C 下水浴 15 min，行甲酯化反應。待試管冷卻至室溫，加入 1ml 飽和食鹽水，防止乳化作用，之後加入 2ml n-Hexane，vortex 5 分鐘以萃取脂肪酸甲脂，取上層 n-Hexane 層，利用氣相層析儀 (Thermo model Focus GC series) 來量測(圖 3-1)。

毛細管柱為 SEG BP20 (25 m×0.22 mm×0.25 μm)，起始溫度 200°C，維持 1 min 後以 10°C/min 之速率升溫至 210°C，維持 10 min 後以 16°C/min 之速率升溫至 220°C，維持 22.4 min 後再以 10°C/min 之速率升溫至 230°C，維持 5 min；注射孔 (injector)，溫度 230°C；偵測器為火焰離子偵測器 (FID detector)，溫度 230°C；運送氣體 (carrier gas) 為氮氣 (nitrogen)，流量 25 ml/min。注射上清液體積為 1 μl。

波峰面積和脂質成分濃度作圖，獲得檢量線：

Methyl tetradecanoate (C14:0): Concentration(g/l)=Area/748255

Methyl palmitate (C16:0): Concentration(g/l)=Area/731173

Palmitoleic acid methyl ester (C16:1): Concentration(g/l)=Area/760568

Methyl stearate (C18:0): Concentration(g/l)=Area/785914

Methyl oleate (C18:1): Concentration(g/l)=Area/525880

Linoleic acid methyl ester (C18:2): Concentration(g/l)=Area/828305

Linolenic acid methyl ester (C18:3): Concentration(g/l)=Area/745008

(附錄 B)

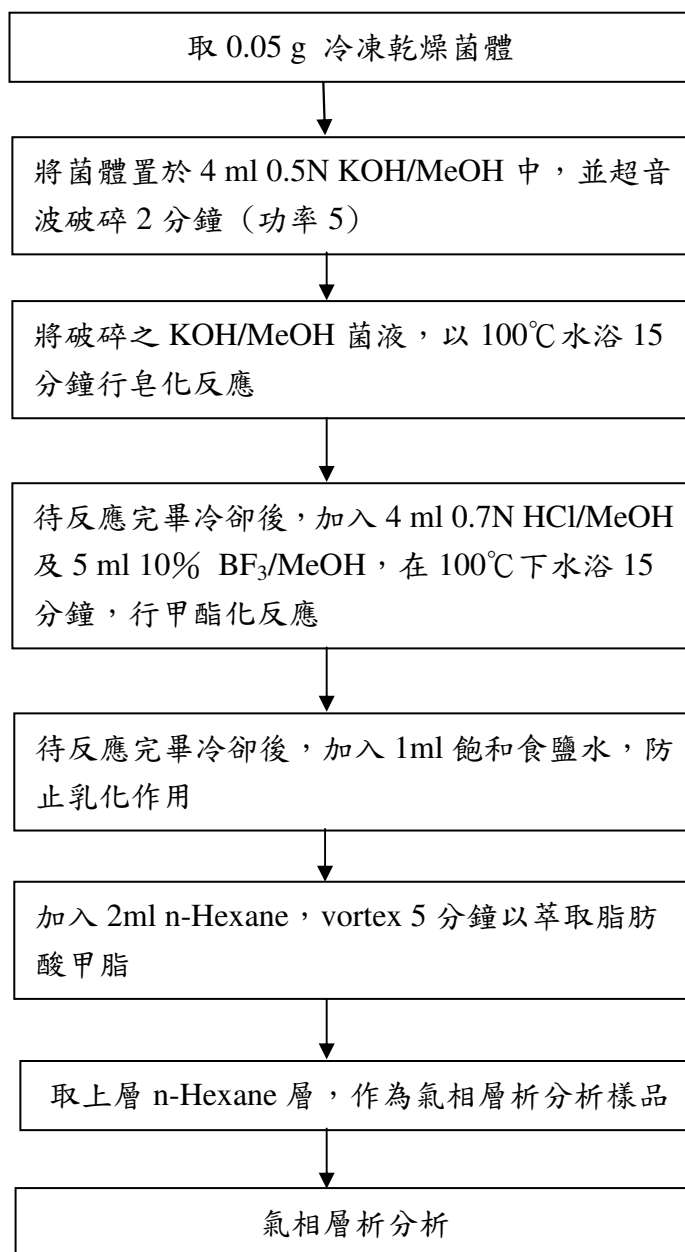


圖 3-2 脂肪酸分析之樣品前處理流程圖

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 medium, SM)

表 3-3 種子培養基

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

依上述比例配製成的培養基，即為 Yeast Malt Broth (YM BROTH)，以 1 N HCl 調整 pH 值為 5.5。

3.4.2.2 發酵培養基 (fermentation medium, FM)

表 3-4 發酵培養基

Compounds	Concentration (g/l)
Glucose	30、60、140 g/l
Yeast extract	2.0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 g/l
KH ₂ PO ₄	1.0 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g/l

CaCl₂ · 2H₂O 0.1 g/l

NaCl 0.1 g/l

依上述比例配製成的培養基，以 1 N HCl 調整 pH 值為 5.5，Glucose 濃度依實驗需求不同而改變。

3.4.3 接菌

將培養 24 hr 之 Seed medium 接至 Fermentation medium 中，接菌量為 Fermentation medium 10%之體積。

3.5 實驗架構

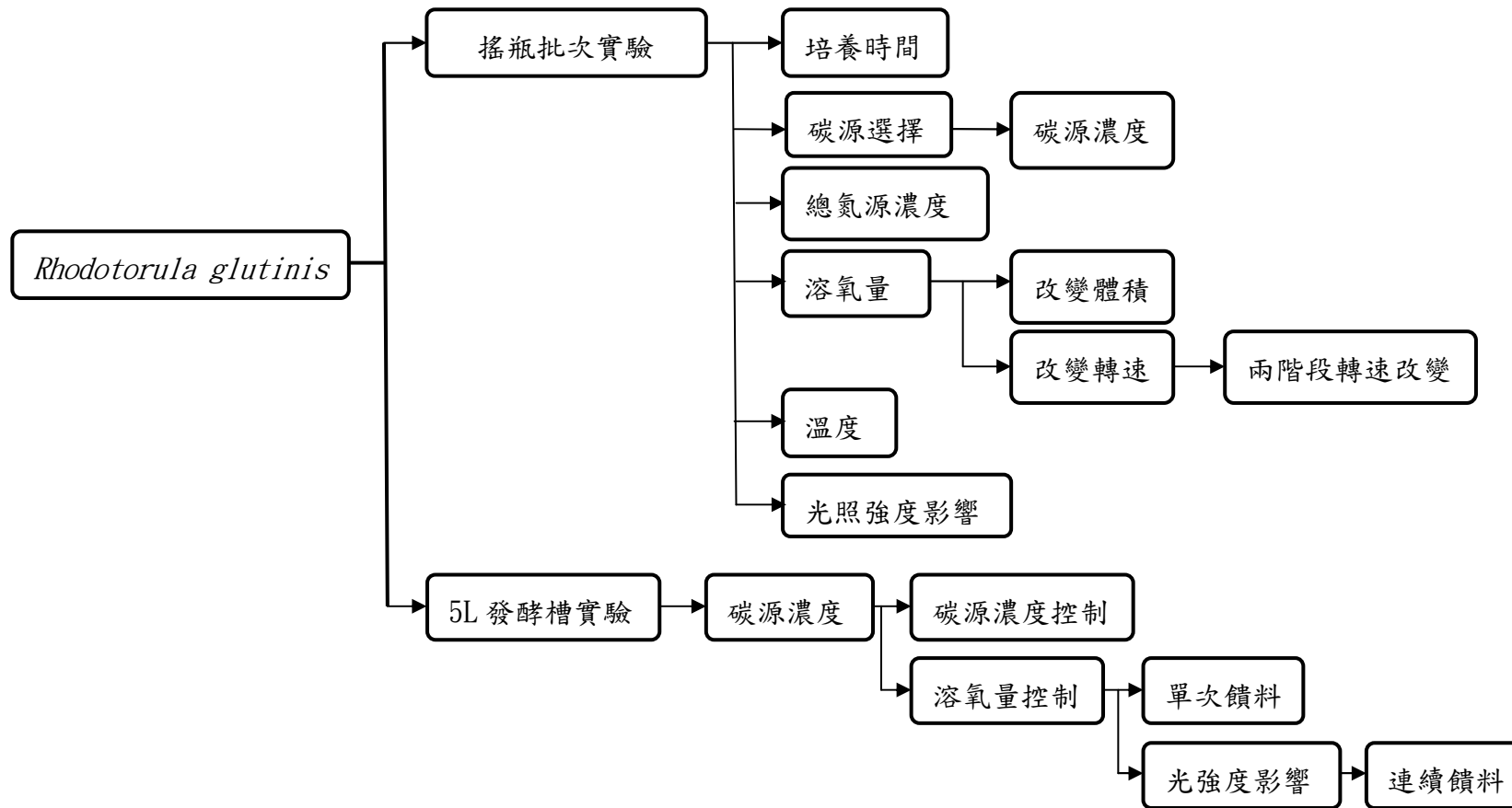


圖 3-3 實驗架構

3.6 實驗培養條件

3.6.1 搖瓶批次發酵程序 (flask experiment)

3.6.1.1 培養時間之影響

目的:探討培養時間對菌體生長與累積脂質之影響。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
2. 於 50 ml FM 培養基中添加碳源濃度為 15 g/l 的葡萄糖。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中。
4. 於 24°C、150rpm 培養箱中培養 96 小時，每 24 小時取樣三瓶。

3.6.1.2 不同碳源之影響

目的:探討不同碳源(葡萄糖、糖蜜、甘油、水溶性澱粉)對菌體生長與累積脂質之影響。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
2. 於 50 ml FM 培養基中各別添加葡萄糖、糖蜜、甘油、水溶性澱粉，碳源濃度為 30 g/l。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中。
4. 於 24°C、150 rpm 培養箱中培養 48 小時。

3.6.1.3 碳源濃度之影響

目的:探討培養基中不同起始葡萄糖濃度對菌體生長與累積脂質之影響。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
2. 於 50 ml FM 培養基中各別添加濃度為 15、30、45、60 g/l 的葡萄糖。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中。
4. 於 24°C、150rpm 培養箱中培養 48 小時。

3.6.1.4 氮源濃度之影響

目的:探討培養基中不同總氮源濃度對菌體生長與累積脂質之影響。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
2. 於 50 ml FM 培養基中各別添加 2、4、6、8、10、12 g/l 的總氮源，其中
氮源組成比例為 yeast extract : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 1 : 1$
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中。
4. 於 24°C、150 rpm 培養箱中培養 48 小時。

3.6.1.5 改變 FM 體積之影響

目的:藉由改變 FM 培養液的體積，來探討溶氧量高低對菌體生長與累積脂質之影響。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。

2. 各別配製 30、40、50 ml FM 培養基於平底的搖瓶中及 50 ml FM 培養基於底部有檔板的搖瓶中。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中。
4. 於 24°C、150 rpm 培養箱中培養 48 小時。

3.6.1.6 改變轉速之影響

目的:藉由改變培養箱的轉速，進一步證實溶氧量高低對菌體生長與累積脂質之影響。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
2. 以 10% 接菌量將 SM 接至 50 ml FM 培養基中。
3. 各別設定培養箱轉速為 60、150、210 rpm 於 24°C 下培養 48 小時。

3.6.1.7 兩階段改變轉速之影響

目的:藉由分段式改變培養箱的轉速，來探討兩階段溶氧量改變對菌體生長與累積脂質之影響。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
2. 以 10% 接菌量將 SM 接至 50 ml FM 培養基中。
3. 於 24°C、210 rpm 培養箱中培養 24 小時後，再將培養箱的轉速改為 60 rpm，繼續培養至 48 小時。

3.6.1.8 不同溫度下之影響

目的:探討不同培養溫度對菌體生長與累積脂質之影響。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
2. 以 10% 接菌量將 SM 接至 50 ml FM 培養基中。
3. 設定培養箱溫度為 18、24、27、30 °C 於 150 rpm 下培養 48 小時。

3.6.1.9 光照強度之影響

目的:探討光照強度對菌體生長與累積脂質之影響。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
2. 以 10% 接菌量將 SM 接至 50 ml FM 培養基中。
3. 於 24°C、150 rpm 並架有三支 T5 日光燈(光強度為 $94.17 \mu\text{mole photon/s/m}^2$)
的培養箱中培養 48 小時。

3.6.2 攪拌式發酵槽批次程序 (batch)

3.6.2.1 改變碳源濃度之影響

目的:探討起始葡萄糖濃度及製程放大下對菌體生長與累積脂質之影響。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
2. 配製 2000 ml FM 培養基，各別添加濃度為 60、100、140 g/l 的葡萄糖，
於 5-L 發酵槽中。

3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中，培養基初始 pH 5.5，以 1N NaOH 調控 pH 5.1，溫度 24°C、溶氧量 30%、通氣量 1 vvm 下進行培養。
4. 每 6~12 小時取樣，培養時間各別為 45、66、108 小時。

3.6.2.2 控制溶氧量之影響

目的:探討當控制溶氧量下對菌體生長與累積脂質之影響。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
2. 配製 2000 ml FM 培養基，碳源濃度為 140 g/l 的葡萄糖，於 5-L 發酵槽中。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中，在通氣量為 1 vvm 的前提下，藉由改變通入氧氣(由氧氣鋼瓶提供)與空氣(由空壓機產生)流量比的方法，各別將溶氧量維持在 $25 \pm 10\%$ 、 $60 \pm 10\%$ 及兩階段溶氧控制(72 小時以前，溶氧量為 $60 \pm 10\%$ ，72 小時以後，改為 $25 \pm 10\%$ 繼續培養)，培養基初始 pH 5.5，以 1N NaOH 調控 pH 5.1，溫度 24°C 下進行培養。
4. 每 6~12 小時取樣並手動調整氧氣與空氣進氣流量，培養時間各別為 120、126、78 小時。

3.6.2.3 光強度之影響

目的:探討光強度對菌體生長與累積脂質之影響。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
2. 配製 2000 ml FM 培養基，碳源濃度為 140 g/l 的葡萄糖，於 5-L 發酵槽中。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中，各別提供二盞 LED 光源(光強度為 $2566.6 \mu\text{mole photon/s/m}^2$)與三盞 LED 光源(光強度為 $3849.9 \mu\text{mole photon/s/m}^2$)來進行培養，其培養基初始 pH 5.5，以 1N NaOH 調控 pH 5.1，溫度 24°C 、溶氧量 30%、通氣量 1 vvm 下進行培養。
4. 每 6~12 小時取樣，培養時間各別為 108、84 小時。

3.6.3 攪拌式發酵槽饋料批次程序 (fed-batch)

3.6.3.1 控制碳源濃度之影響

目的:探討當控制碳源濃度下對菌體生長與累積脂質之影響。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
2. 配製 2000 ml FM 培養基，碳源濃度為 60 g/l 的葡萄糖，於 5-L 發酵槽中。
3. 配製 500 ml 500 g/l 葡萄糖於 1L 血清瓶中當作饋料用碳源。
4. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中，培養基初始 pH 5.5，以 1N NaOH 調控 pH 5.1，溫度 24°C 、溶氧量 30%、通氣量 1 vvm 下進行培養。
5. 當碳源消耗至設定濃度時，開始饋料，葡萄糖濃度各別維持在 10、20、30 g/l。

6. 每 6~12 小時取樣並手動調整進料流速，培養時間各別為 77、120、132 小時。

3.6.3.2 兩階段溶氧量搭配單次饋料之實驗

目的:探討在兩階段溶氧量控制的條件下，利用單次饋料來改善菌體脂質含量之實驗。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
2. 配製 2000 ml FM 培養基，碳源濃度為 140 g/l 的葡萄糖，於 5-L 發酵槽中。
3. 配製 500 ml 500 g/l 葡萄糖於 1L 血清瓶中當作饋料用碳源。
4. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中，在通氣量為 1 vvm 的前提下，藉由改變通入氧氣(由氧氣鋼瓶提供)與空氣(由空壓機產生)流量比的方法，將溶氧量維持在 $60 \pm 10\%$ ，並於 72 小時調整溶氧量至 $25 \pm 10\%$ ，且同時做單次饋料，使槽內葡萄糖濃度上升至 60 g/l，培養基初始 pH 5.5，以 1N NaOH 調控 pH 5.1，溫度 24°C 下進行培養。
5. 每 6~12 小時取樣並手動調整氧氣與空氣進氣流量，培養時間為 156 小時。

3.6.3.3 提供三盞 LED 光源搭配連續饋料之實驗

目的:探討在提供三盞 LED 光源的情況下，作連續式饋料來改善菌體脂質含量之實驗。

1. 前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
2. 配製 2000 ml FM 培養基，碳源濃度為 140 g/l 的葡萄糖，於 5-L 發酵槽中。
3. 配製 500 ml 500 g/l 葡萄糖於 1L 血清瓶中當作饋料用碳源。
4. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中，提供三盞 LED 光源(光強度為 $3849.9 \mu\text{mole photon/s/m}^2$)來進行培養，於 72 小時開始做連續饋料，將葡萄糖濃度維持在 30 g/l，其培養基初始 pH 5.5，以 1N NaOH 調控 pH 5.1，溫度 24°C 、溶氧量 30%、通氣量 1 vvm 下進行培養。
5. 每 6~12 小時取樣，培養時間為 144 小時。

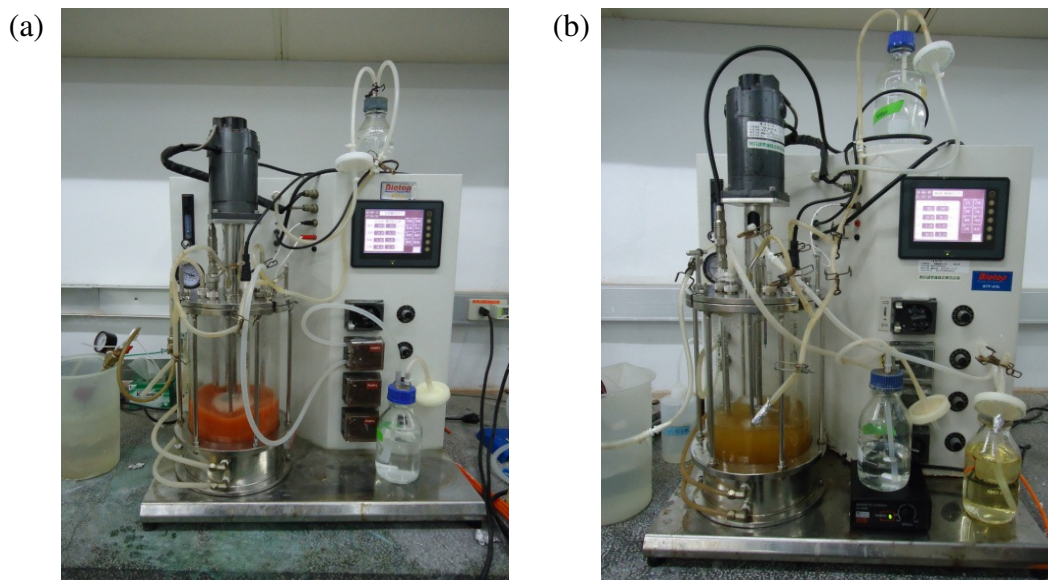


圖 3-4 (a) 批次發酵裝置圖；(b) 饋料批次發酵裝置圖(饋料碳源為 500 g/l glucose)



圖 3-5 溶氧量控制下之批次發酵裝置圖



圖 3-6 提供光源下之搖瓶培養裝置圖

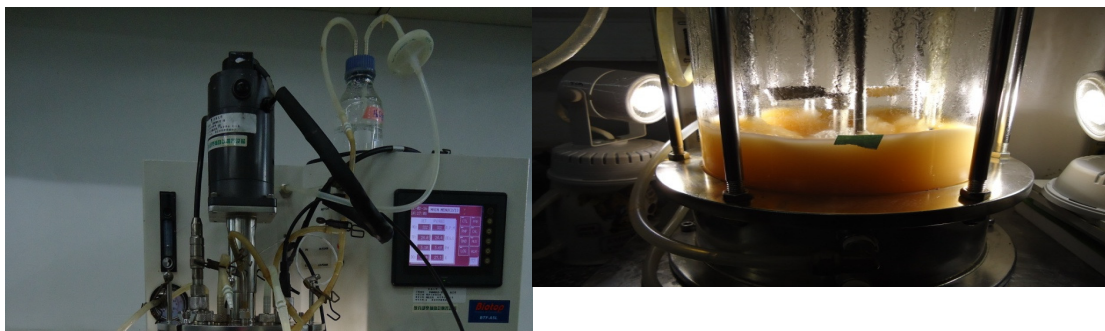




圖 3-7 探討光強度影響之批次發酵裝置圖



圖 3-8 提供三盞 LED 光源下之連續饋料批次發酵裝置圖

第四章 結果與討論

4.1 *Rhodotorula glutinis* 之脂肪酸分析結果

首先對於菌種中心所取得之 *R. glutinis* BCRC22360 初步之脂肪酸組成分析。根據 Bong Kyun Kim 等(2004) 所最適化出來的培養基培養，收取菌體並以上述 3.3.5 之處理步驟，從已轉脂化處理後的樣品中萃取出脂肪酸甲酯，利用氣相層析分析組成。氣相層析結果如圖 4.1 所示。

在定性方面，與脂肪酸標準品對照得知(圖 4.1)，*R. glutinis* 中的脂肪酸組成包含 C14:0 (滯留時間為 12.4 分鐘)、C16:0 (滯留時間為 16.7 分鐘)、C16:1 (滯留時間為 17.7 分鐘)、C18:0 (滯留時間為 24.1 分鐘)、C18:1 (滯留時間為 25.3 分鐘)、C18:2 (滯留時間為 28.0 分鐘)、C18:3 (滯留時間為 32.1 分鐘)。由氣相層析儀分析顯示，油脂酵母菌 *Rhodotorula glutinis* 細胞內所含的脂質，以 16 和 18 碳的脂肪酸為主，其中以油酸(C18:1)占 50~60%、棕櫚酸(C16:0)占 20~30%這兩種脂肪酸所占的比例最高，且類似植物油的組成，可作為替代性油料之來源。

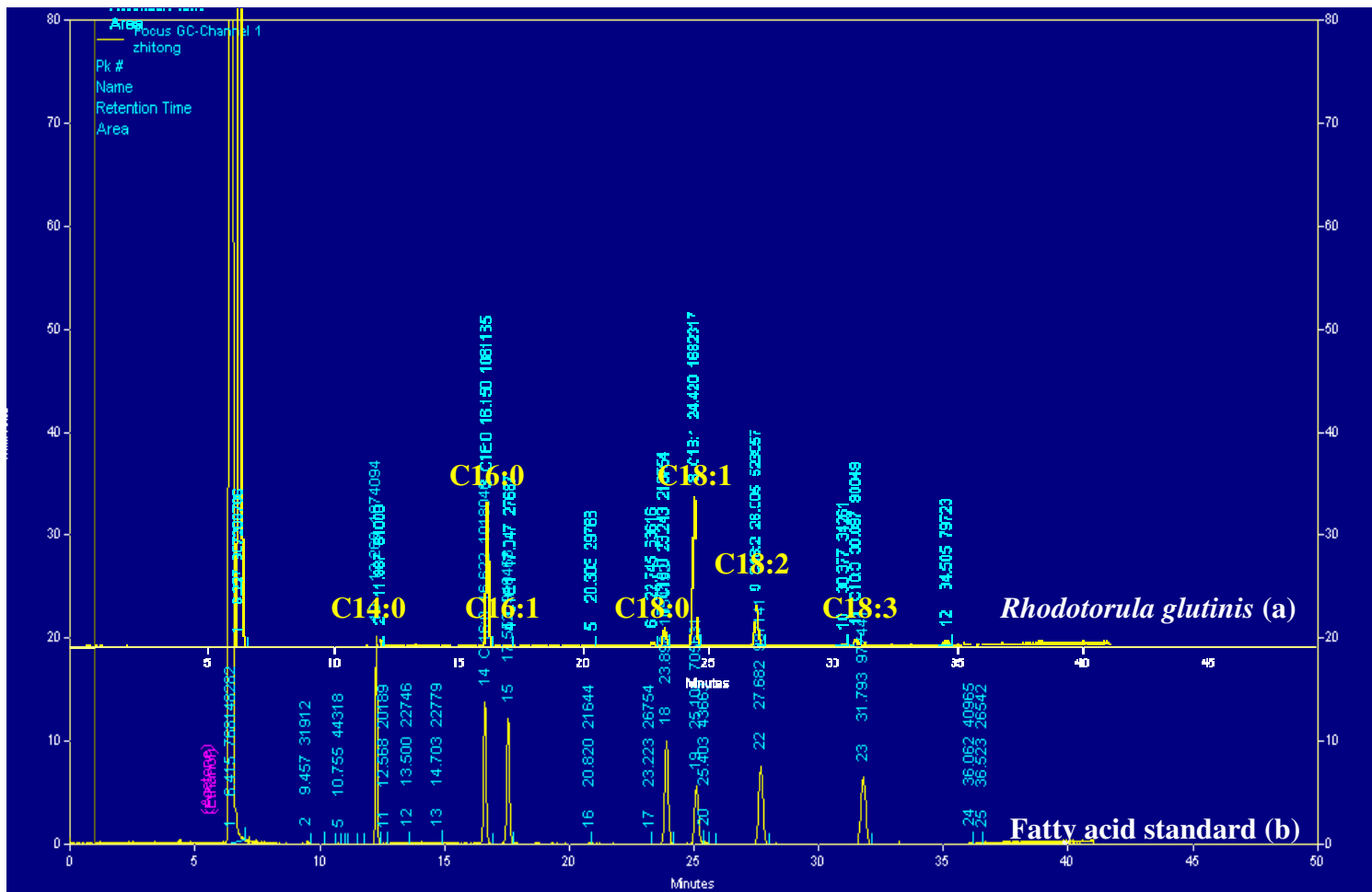


圖 4-1 脂肪酸分析圖: (a) *Rhodotorula glutinis* 油脂之脂肪酸成分; (b) 定性用脂肪酸標準品

4.2 搖瓶批次發酵程序 (flask experiment)

4.2.1 培養時間之影響

本次實驗探討培養時間對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。實驗結果如圖 4-2、表 4-1 與表 4-2 所示，與 Bong Kyun Kim 等(2004)所獲得之結果是一致地，同樣於培養 24 hr 期間，發酵液中的 pH 值會從起始 5.5 迅速降至 2 左右，將會影響到菌體生長與累積油脂，根據文獻建議，嘗試利用磷酸緩衝溶液來進行改善，但效果並不顯著，因此，後續實驗將會固定培養時間在 48 hr 之內，進行搖瓶實驗。

而搖瓶實驗中碳源(葡萄糖)濃度之變化，也會影響到菌體生長與累積油脂，於 48 小時，碳源耗盡之後，*R. glutinis* 為了維持生長，將會開始利用細胞中所累積之油脂，導致油脂含量下降，此現象與文獻相符合(Kavadia et al., 2001)。

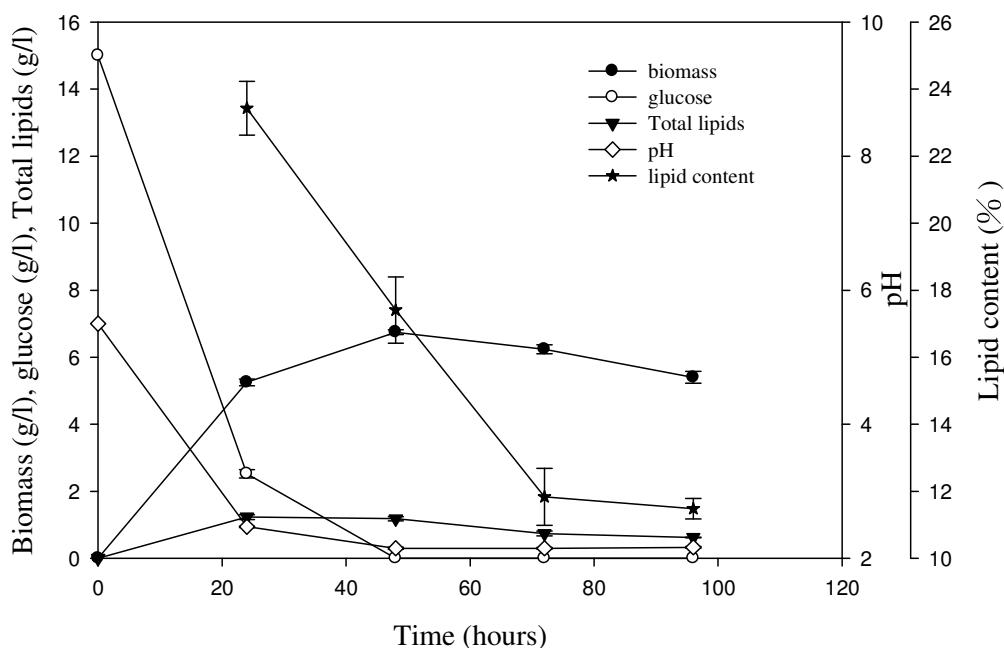


圖 4-2 Time course 對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

表 4-1 不同培養時間對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

Incubation time (hour)	Final pH	Glucose (g/l)	Biomass (g/l)	Lipid content (% w/w)	Total lipids (g/l)
0	5.5	15.0	0	0	0
24	2.5	2.5±0.1	5.3±0.1	23.4±0.8	1.2±0.1
48	2.2	0.0	6.8±0.1	17.4±0.9	1.2±0.1
72	2.2	0.0	6.2±0.1	11.8±0.8	0.7±0.1
96	2.2	0.0	5.4±0.2	11.5±0.3	0.6

表 4-2 不同培養時間之脂肪酸組成表

Incubation time (hour)	Relative amount of total fatty acids (% w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
72	1.5	11.6	1.5	1.7	70.7	10.3	2.6
96	0	13.7	1.8	3.9	70.7	10.0	0

4.2.2 不同碳源之影響

本次實驗探討不同碳源(葡萄糖、糖蜜、甘油、水溶性澱粉)對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。實驗結果如圖 4-3、表 4-3、表 4-4 所示，以葡萄糖和糖蜜為碳源有較高之菌體濃度，分別約有 8.4 g/l 及 8.6 g/l，其次是以甘油為碳源約有 6.9 g/l 之菌體濃度，最差的是以水溶性澱粉為碳源僅約有 0.9 g/l 之菌體濃度，推測是菌體無法產生澱粉水解酵素，從而導致較低之菌數量；在菌體累積油脂方面，則是以葡萄糖為碳源有較高之油脂含量約占細胞乾重的 22.3%，之後依序為糖蜜(17.7%)、甘油(17.4%)、水溶性澱粉(6.9%)，由本次實驗結果來看，以葡萄糖當作碳源，較能有效生產油脂，其原因在於葡萄糖相較其它三種碳源之分子小，容易被微生物代謝與吸收，且在代謝路徑上來說，也較容易提供合成油脂時所需的 NADPH，因此，選定葡萄糖當作後續培養所使用的碳源。

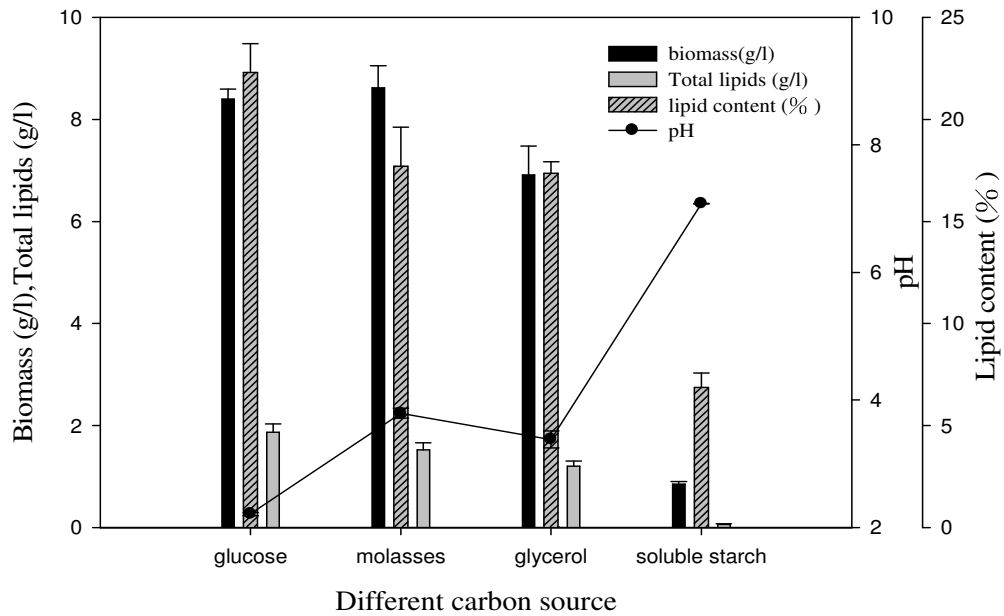


圖 4-3 不同碳源對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

表 4-3 不同碳源對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

Carbon Source	Final pH	Biomass (g/l)	Lipid content (% , w/w)	Total lipids (g/l)
Glucose	2.2	8.4±0.2	22.3±1.4	1.87±0.2
Molasses	3.5	8.6±0.4	17.7±1.9	1.5±0.1
Glycerol	2.9±0.1	6.9±0.6	17.4±0.6	1.2±0.1
Soluble starch	7.3	0.9±0.1	6.9±0.7	0.1

表 4-4 不同碳源之脂肪酸組成表

Carbon Source	Relative amount of total fatty acids (% , w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Glucose	0.8	15	0.4	6.1	72.2	3.5	1.9
Molasses	1.2	14.4	2.2	3.4	67.6	9.5	1.6
Glycerol	0.8	13.2	1.7	4.6	68.2	8.8	2.7
Soluble starch	0	21.4	0	7.7	44.5	20.2	6.3

4.2.3 碳源濃度之影響

在選定較佳碳源(葡萄糖)之後，本次實驗將探討不同起始葡萄糖濃度(15 g/l、30 g/l、45 g/l、60 g/l)對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。實驗結果如圖 4-4、表 4-5、表 4-6 所示，隨著起始葡萄糖濃度的增加，菌體濃度與油脂含量也會隨之增加，以起始葡萄糖濃度為 15 g/l 下所獲得之數據各別與 30 g/l、45 g/l、60 g/l 作比較，可以很明顯看出差異性，但是以起始葡萄糖濃度為 30 g/l 各別與 45 g/l、60 g/l 作比較時，其菌體濃度之差異變得很不明顯，且油脂含量僅略有些微差距，這種現象的產生，推測是 pH 降太低所致(起始 pH 值為 5.5，於發酵 24 hr 後 pH 值迅速降至 2 左右)，因此，將固定起始葡萄糖濃度為 30 g/l 來作後續搖瓶實驗之探討，而提高碳源濃度之實驗將會利用 5-L 發酵槽系統，在控制 pH 的情況下，來進行更有效之研究。

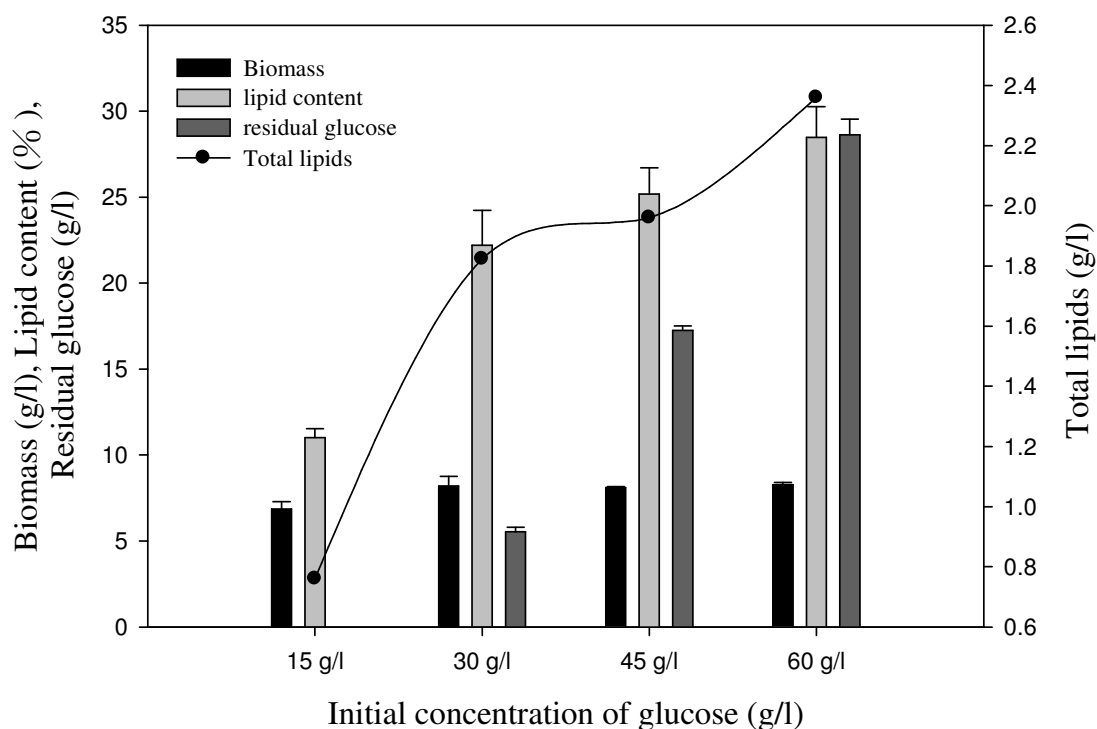


圖 4-4 不同起始 glucose 濃度對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

表 4-5 不同起始 glucose 濃度對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

Initial concentration of glucose (g/l)	Final pH	Residual glucose (g/l)	Biomass (g/l)	Lipid content (% w/w)	Total lipids (g/l)
15	2.3	0.0	6.9±0.4	11.0±0.5	0.8
30	2.2	5.5±0.3	8.2±0.5	22.2±2.0	1.8±0.3
45	2.2	17.3±0.3	8.1	25.2±1.5	2.0±0.1
60	2.2	28.6±0.9	8.3±0.1	28.5±1.8	2.4±0.2

表 4-6 不同起始 glucose 濃度之脂肪酸組成表

Initial concentration of glucose (g/l)	Relative amount of total fatty acids (% w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
45	6.2	12.3	1.3	4.7	72.5	2.2	0.8
60	0.7	13.5	1.1	4.2	77.5	2.2	0.8

4.2.4 氮源濃度之影響

本次實驗探討不同起始氮源濃度(2 g/l、4 g/l、6 g/l、8 g/l、10 g/l、12 g/l)對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。實驗結果如圖 4-5、表 4-7、表 4-8 所示，隨著起始氮源濃度的增加，很明顯地油脂含量與油脂濃度會隨之下降，而菌體濃度僅有些微的上升，由此推測氮源濃度的提升對於 *R. glutinis* 累積油脂與菌體生長，弊大於利，所以建議以較低地氮源濃度來進行培養，將有助於油脂之生產，其結果也與文獻上，所提到之油脂性微生物必須在較低氮源濃度的條件下，才能更有效去累積油脂的現象相符合。

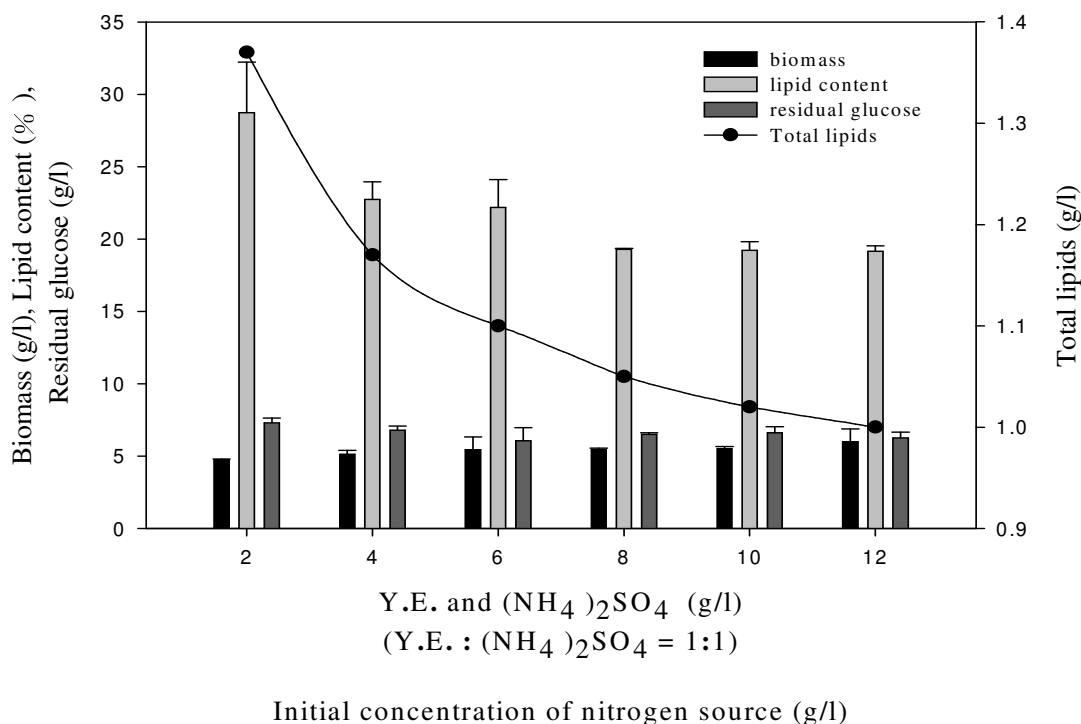


圖 4-5 不同起始氮源濃度對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

表 4-7 不同起始氮源濃度對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

Initial concentration of nitrogen source (g/l)	Final pH	Residual glucose (g/l)	Biomass (g/l)	Lipid content (% (w/w))	Total lipids (g/l)
2	2.2	7.3±0.3	4.8	28.7±3.5	1.4±0.2
4	2.4	6.8±0.3	5.1±0.3	22.8±1.2	1.2±0.3
6	2.6	6.1±0.9	5.4±0.9	22.2±1.9	1.1±0.1
8	2.7±0.1	6.5±0.1	5.5±0.1	19.3±0.1	1.1
10	2.9±0.1	6.6±0.4	5.6±0.1	19.2±0.6	1.0±0.1
12	3.0±0.2	6.3±0.4	6.0±0.9	19.1±0.4	1.0±0.2

表 4-8 不同起始氮源濃度之脂肪酸組成表

Initial concentration of nitrogen source (g/l)	Relative amount of total fatty acids (% (w/w))						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
2	0.7	14.9	1.0	6.3	71.1	3.6	1.8
4	0.5	14.7	0.9	5.2	74.0	2.8	2.0
6	0.7	14.1	0.9	5.1	74.3	3.7	1.3
8	1	13.7	1.1	4.9	73.5	4.5	1.3
10	1	14.9	1.3	4.8	74.7	2.5	0.8
12	0.9	15.0	1.2	4.3	73.9	3.7	1.1

4.2.5 改變 FM 體積之影響

文獻指出，發酵液中的溶氧量(DO 值)會直接影響微生物之酵素的活性、代謝途徑及產物產量，尤其是對專性需氧菌 *R. glutinis* 來說，更顯得重要(Zhang Ping et al., 2007)。因此，本次實驗採用容積為 250 ml 平底搖瓶，透過改變發酵液體積(30 ml、40 ml、50 ml)及 50 ml 裝於有檔板的搖瓶中(圖 4-6)，來探討溶氧量對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。實驗結果如圖 4-7、表 4-9、表 4-10 所示，在平底搖瓶實驗中，隨著裝液量的上升，油脂含量也隨之上升，而增加裝液量，將會降低氧氣的傳輸速率，使溶氧量下降，另外，比較發酵液體積為 50 ml 有、無(平底)檔板之實驗，很明顯地有檔板之油脂含量較平底搖瓶低，而有檔板則會增加液體之混合效果，使溶氧量提高，由本次實驗結果得知，低溶氧將有助於 *R. glutinis* 累積油脂，而菌體濃度在本次實驗看來並無明顯之差異性。

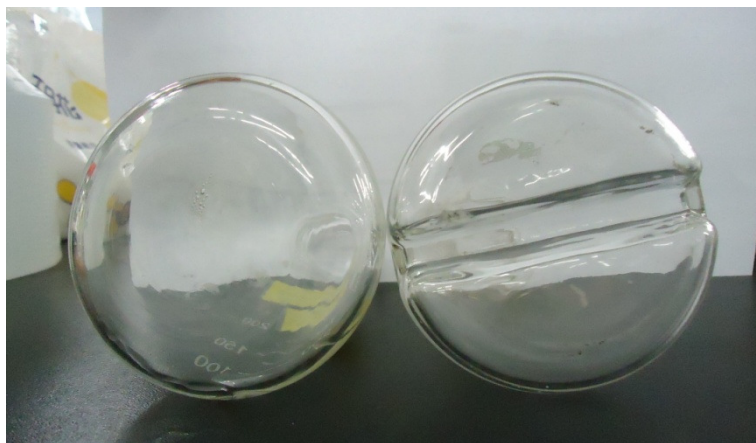


圖 4-6 左:容積為 250 ml 平底的搖瓶；右:容積為 250 ml 有檔板的搖瓶

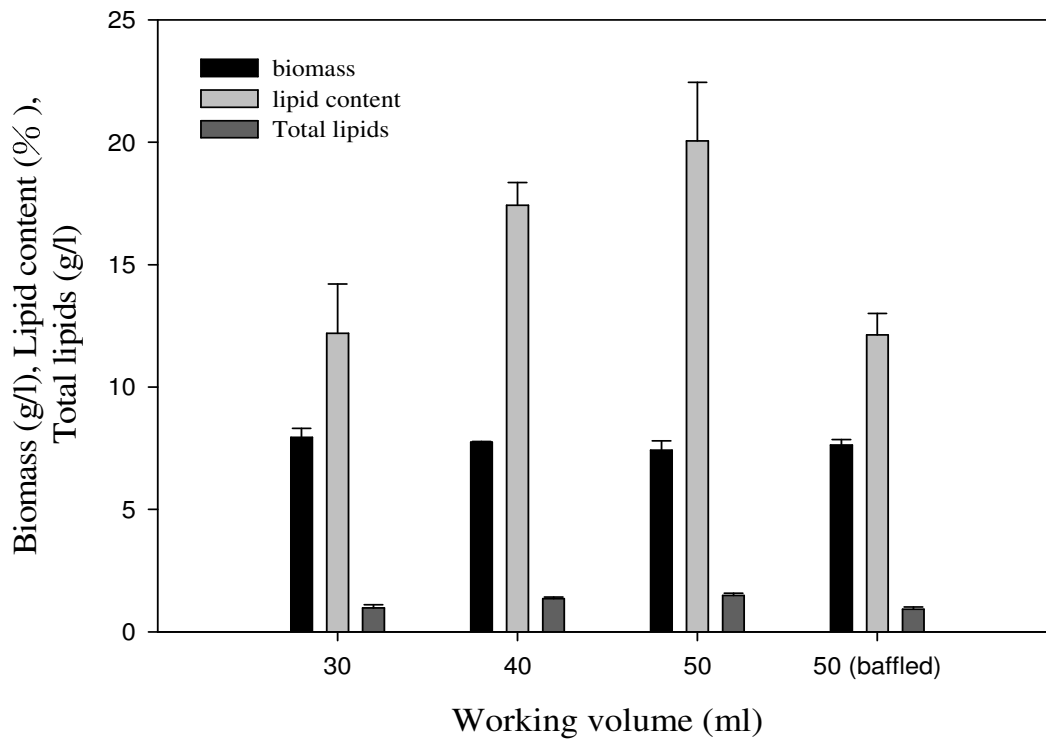


圖 4-7 不同培養體積對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

表 4-9 不同培養體積對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

Working volume (ml)	Final pH	Biomass (g/l)	Lipid content (% w/w)	Total lipids (g/l)
30	2.1	8.0±0.4	12.2±2.0	1.0±0.1
40	2.2	7.6	17.4±0.9	1.4±0.1
50	2.2	7.4±0.4	20.1±2.4	1.5±0.1
50 (baffled)	2.1	7.6±0.2	12.1±0.9	0.9±0.1

表 4-10 不同培養體積之脂肪酸組成表

Working volume (ml)	Relative amount of total fatty acids (% w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
30	2.4	12.4	0.0	4.8	65.8	12.2	2.5
40	0.9	12.1	1.0	3.9	69.9	10.3	2.0
50	0.9	11.5	1.5	4.0	73.4	6.8	2.0
50 (baffled)	0.9	12.5	2.3	5.1	62.8	13.9	2.4

4.2.6 改變轉速之影響

為了進一步證實溶氧量對 *R. glutinis* 累積油脂之影響，本次實驗採用平底搖瓶，以相同裝液量(50 ml)，再透過改變轉速(60 rpm, 150 rpm, 210 rpm)的方式，來探討溶氧量對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。實驗結果如圖 4-8、表 4-11、表 4-12 所示，隨著轉速的上升，將會增加發酵液之混合效果，進而提高溶氧量，在較高轉速(210 rpm)下，有較佳之菌體濃度，其殘糖濃度也較低；而較低轉速(60 rpm)下，則有較佳之油脂含量，其殘糖濃度較高，綜合本次實驗結果與改變體積之結果顯示，在搖瓶實驗中，高 DO 環境將增加細胞的生長，而低 DO 環境則有助於油脂的累積。

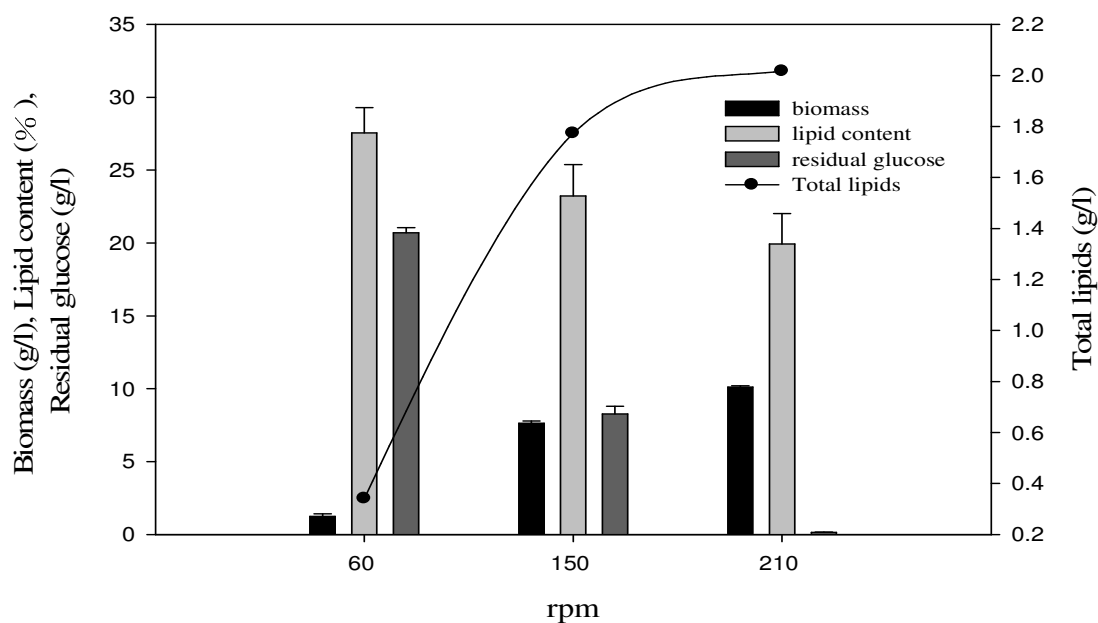


圖 4-8 不同培養轉速對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

表 4-11 不同培養轉速對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

Rpm	Final pH	Residual glucose (g/l)	Biomass (g/l)	Lipid content (% w/w)	Total lipids (g/l)
60	3.7±0.1	20.7±0.3	1.3±0.2	27.6±1.7	0.3
150	2.2	8.3±0.5	7.6±0.1	23.2±2.2	1.8±0.1
210	2.1	0.2	10.1±0.1	19.9±2.1	2.0±0.2

表 4-12 不同培養轉速之脂肪酸組成表

shaking speed (rpm)	Relative amount of total fatty acids (% w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
60	1.7	19.2	1.4	5.0	50.1	16.5	6.0
150	0.9	13.5	1.0	5.6	74.4	3.2	1.5
210	1.1	14.8	1.3	5.4	72.0	3.7	1.7

4.2.7 兩階段改變轉速之影響

由上述實驗結果得知，高轉速可以有較高的菌數量，但較低的油脂含量，反之，低轉速則會有較高的油脂含量，但較低的菌數量。因此，本此實驗將藉由階段式改變轉速的方式，來探討兩階段溶氧量改變對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。最初在轉速為 210 rpm 的條件下培養 24 hr，以刺激細胞的快速增長，再此之後，調整轉速為 60 rpm 的條件下繼續培養 24 hr，以累積細胞中的油脂，實驗結果如圖 4-9、表 4-13、表 4-14 所示，將兩階段轉速改變之數據與控制組作比較得知，在起始發酵 24 hr 降低轉速後，顯著延緩細胞的生長，但有較高的油脂含量。因此，溶氧量對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響，據推測高 DO 值會導致菌體迅速增長，但會降低油脂的含量。

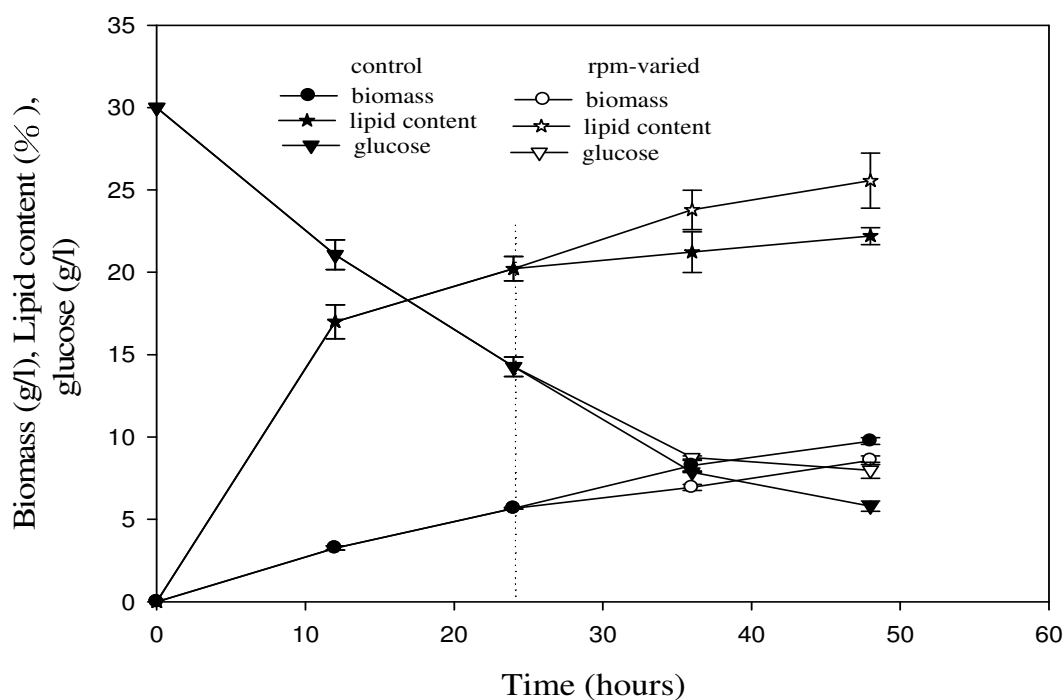


圖 4-9 兩階段轉速改變對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

表 4-13 兩階段轉速改變對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

Two-stage shaking speed varied (hour, rpm)	Final pH	Residual glucose (g/l)	Biomass (g/l)	Lipid content (% w/w)	Total lipids (g/l)
Control (12,210)	2.7	21.1±0.9	3.3±0.1	17.0±1.0	0.6
Control (24,210)	2.3	14.3±0.6	5.7	20.2±0.7	1.2
Control (36,210)	2.3	7.9	8.3±0.3	21.2±1.2	1.8±0.2
Control (48,210)	2.3	5.8±0.3	9.8±0.2	22.2±0.5	2.2±0.1
Rpm-varied (36,60)	2.2	8.7±0.1	6.9±0.2	23.8±2.5	1.7±0.2
Rpm-varied (48,60)	2.3	8.0±0.5	8.6±0.3	25.6±1.7	2.2±0.2

表 4-14 兩階段轉速改變之脂肪酸組成表

Two-stage shaking speed varied (hour, rpm)	Relative amount of total fatty acids (% w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Control (36,150)	1.3	15.3	1.0	4.7	72.0	4.4	1.3
Control (48,150)	1.0	14.1	1.0	4.3	74.7	3.4	1.6

Rpm-varied (36,60)	1.2	15.5	1.3	3.8	70.5	5.7	2.1
Rpm-varied (48,60)	0.8	15.2	1.2	3.6	74.1	4.3	1.0

4.2.8 不同溫度下之影響

文獻指出，提高培養溫度可促進細胞生長速率，因而提高脂肪酸累積量，但溫度高於 35°C 時，不利 *R. glutinis* 的生長，而溫度低於 20°C，菌體生長速率非常遲緩，因此，本次實驗將探討不同培養溫度(18°C、24°C、27°C、30°C)對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。實驗結果如圖 4-10、表 4-15、表 4-16 所示，當培養溫度為 24°C 時，可以獲得較高之油脂含量(22.2%)，接著依序為 18°C(14.6%)、27°C(10.8%)、30°C(10.4%)，且培養溫度為 24°C 時，有較低之殘糖濃度為 3.1 g/l。

在菌體濃度方面，以培養溫度各別為 24°C(9.7 g/l)、27°C(9.7 g/l)、30°C(9.7 g/l) 之差異性並不大，但皆高於培養溫度為 18°C(9.3 g/l) 之菌數量，因此，選定 24°C 當作後續實驗之培養溫度。另外，發現在較低溫的情況下，其油脂之不飽和度較高，推測是微生物為了要適應低溫，而增加多元不飽和脂肪酸之生成。

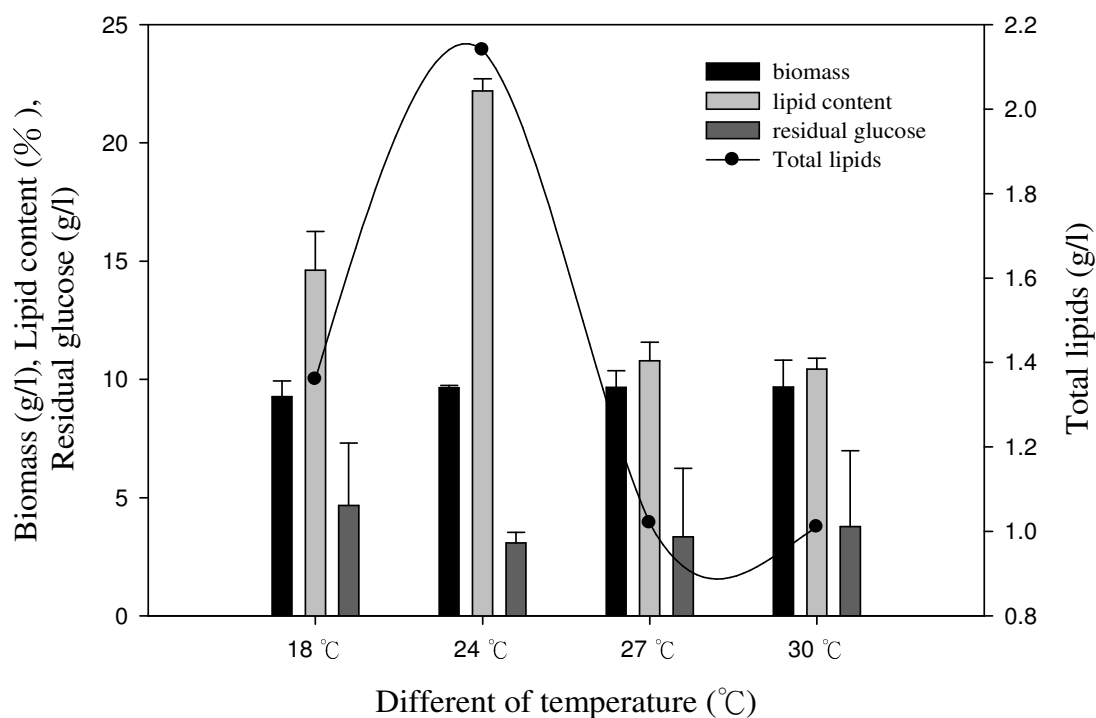


圖 4-10 不同培養溫度對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

表 4-15 不同培養溫度對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

Temperature (°C)	Final pH	Residual glucose (g/l)	Biomass (g/l)	Lipid content (% w/w)	Total lipids (g/l)
18	1.9	4.7±2.6	9.3±0.7	14.6±1.6	1.4±0.2
24	1.9	3.1±0.4	9.7±0.1	22.2±0.5	2.1±0.1
27	2.0	3.3±2.9	9.7±0.7	10.8±0.8	1.0±0.1
30	1.9	3.8±3.2	9.7±1.2	10.4±0.5	1.0±0.1

表 4-16 不同培養溫度之脂肪酸組成表

Temperature (°C)	Relative amount of total fatty acids (% w/w)							
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Δ
18	1.1	17.5	0	6.0	65.6	7.7	2.2	0.87
24	0.9	13.5	0.95	5.6	74.4	3.2	1.5	0.86
27	0	15.0	0	6.9	73.2	4.1	0.9	0.84

30	0.7	15.3	0	4.5	75.7	3.9	0	0.83
----	-----	------	---	-----	------	-----	---	------

∆: Degree of unsaturation = 1*(% of monoene) + 2*(% of diene) + 3*(% of triene).

4.2.9 光照強度之影響

文獻指出，*R. glutinis* 在受到弱白光照射下，將有助於類胡蘿蔔素(包含 β-胡蘿蔔素等)之生成(Hideyuki Sakaki et al.,2001)，推測是微生物可以透過照光的方式，去改變其體內蛋白質合成的途徑，進而間接地影響到菌體的生長與代謝產物的生成。因此，本次實驗將探討照光與不照光(暗室)對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。實驗結果如圖 4-11、表 4-17、表 4-18 所示，比較在三支 T5 燈管(光強度為 $94.17 \mu\text{mole/s/m}^2$)照射與不照光(暗室)培養下之數據可得知，照光時能有較高之菌數量，且殘糖濃度較低，但油脂含量較低，反之，不照光時菌數量較低，且殘糖濃度較高，而有較高之油脂含量。因此，初步推測照光將有助於提高菌體的生長，但不利於油脂的累積。

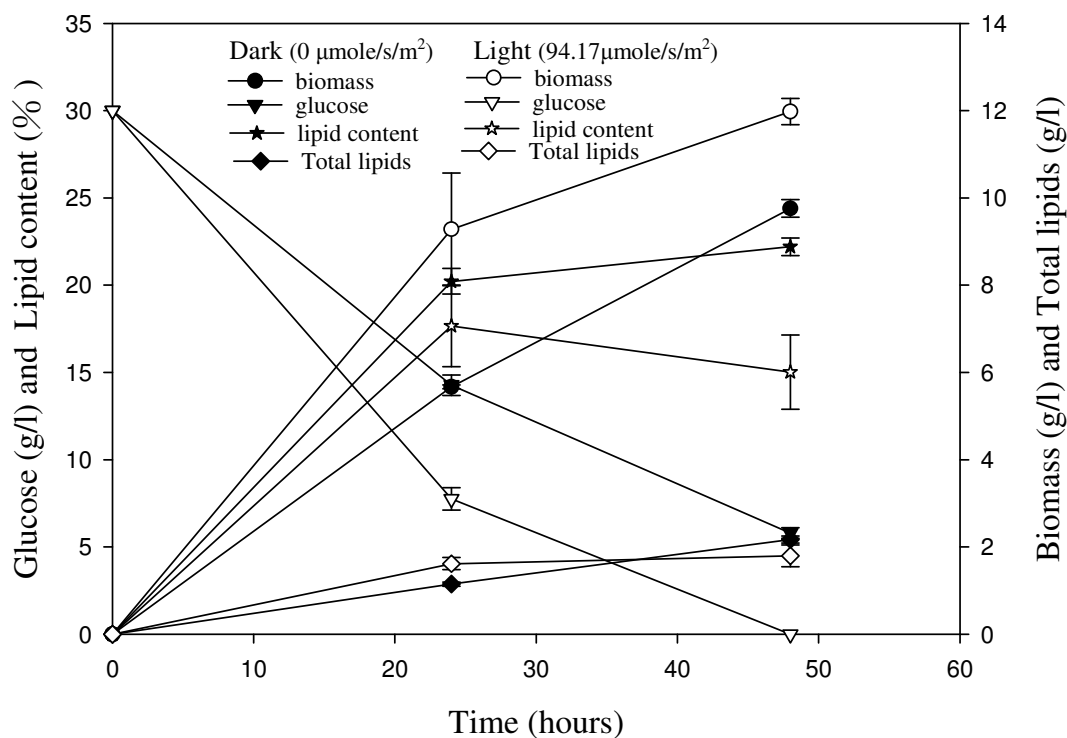


圖 4-11 光照強度對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

表 4-17 光照強度對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

Effect of light irradiation (hour, $\mu\text{mole/s/m}^2$)	Final pH	Residual glucose (g/l)	Biomass (g/l)	Lipid content (% w/w)	Total lipids (g/l)
Dark (24,0)	2.3	14.3 \pm 0.6	5.7	20.2 \pm 0.7	1.2
Dark (48,0)	2.3	5.8 \pm 0.3	9.8 \pm 0.2	22.2 \pm 0.5	2.2 \pm 0.1
Light (24,31.39*3)	1.7	7.8 \pm 0.6	9.3 \pm 1.3	17.7 \pm 2.3	1.6 \pm 0.1
Light (48,31.39*3)	1.5	0	12.0 \pm 0.3	15.0 \pm 2.1	1.8 \pm 0.3

表 4-18 光照強度之脂肪酸組成表

Effect of light irradiation (hour, $\mu\text{mole/s/m}^2$)	Relative amount of total fatty acids (% w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Dark (48,0)	0.9	13.5	1.0	5.6	74.4	3.2	1.5

Light (48,31.39*3)	0.6	15.0	0.7	3.9	72.8	7.1	0.0
--------------------	-----	------	-----	-----	------	-----	-----

4.3 攪拌式發酵槽批次程序 (batch)

4.3.1 改變起始碳源濃度之影響

由搖瓶實驗中得知，以起始葡萄糖濃度在 60 g/l 培養時，並不會對菌體生長產生抑制作用，因此，本次實驗將探討不同起始葡萄糖濃度(60 g/l、100 g/l、140 g/l)對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。實驗結果如圖 4-12、圖 4-13、圖 4-14 所示，起始葡萄糖濃度為 60 g/l 之平均油脂含量(=油脂重量/菌體重量)為 39%、起始葡萄糖濃度為 100 g/l 之平均油脂含量為 49%、起始葡萄糖濃度為 140 g/l 之平均油脂含量為 62%；最大油脂生產速率(=油脂濃度/發酵時間)於起始葡萄糖濃度 60、100、140 g/l 時，分別為 0.27、0.29、0.35 g/l/hr。起始葡萄糖濃度 60、100、140 g/l 時，其最大菌體濃度分別為 29.8、32.9、36.2 g/l；其菌體最大生長速率(=菌體濃度/發酵時間)分別為 0.69、0.68、0.57 g/l/hr；其油脂產率(=生成油脂濃度/消耗葡萄糖濃度)分別為 0.20、0.17、0.21 g/g，此數據與文獻記載中，油脂產率很少超過 0.25 g/g 相符合(C. Ratledge,1988)，說明該菌株在生產過程中具有很好的產油脂能力且基質利用效率很高，具有非常好的工業化生產潛力。

以起始葡萄糖濃度為 140 g/l 批次培養下，並不會對菌體生長產生抑制現象，且由圖 4-15、表 4-19、表 4-20 可得知，菌體濃度(g/l)、油脂含量(%)、最大油脂生產速率(g/l/hr)會隨著起始葡萄糖濃度的提高而增加，因此，建議於批次發酵策略下，以較高起始碳源濃度(起始葡萄糖濃度為 140 g/l)來進行培養，將會是較佳

的選項。

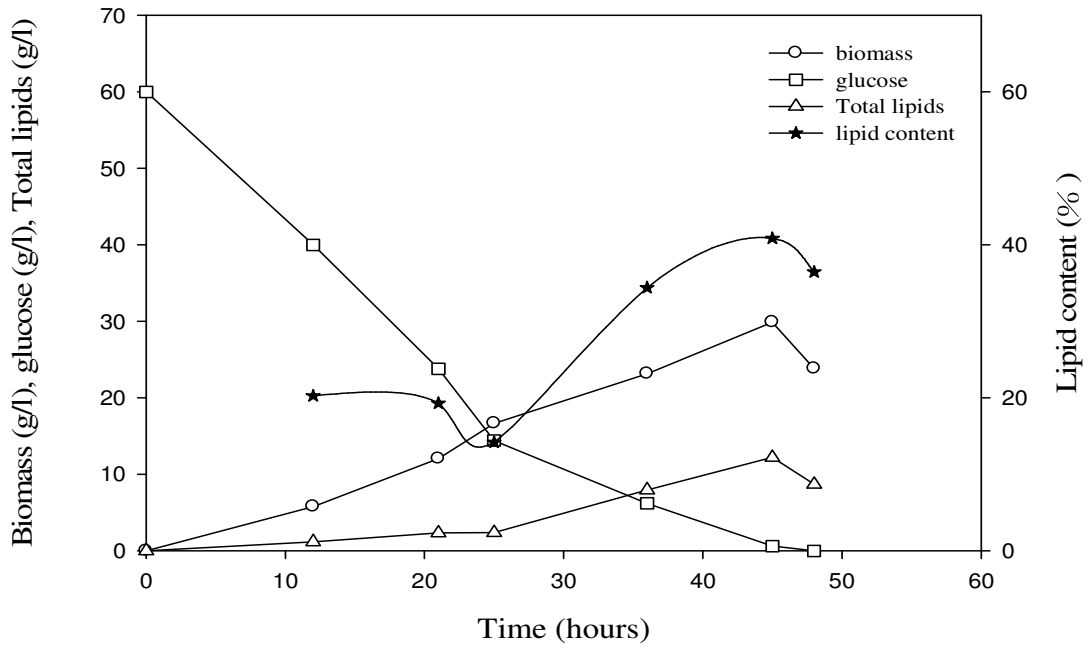


圖 4-12 起始葡萄糖濃度為 60 g/l 之批次發酵策略下, *R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

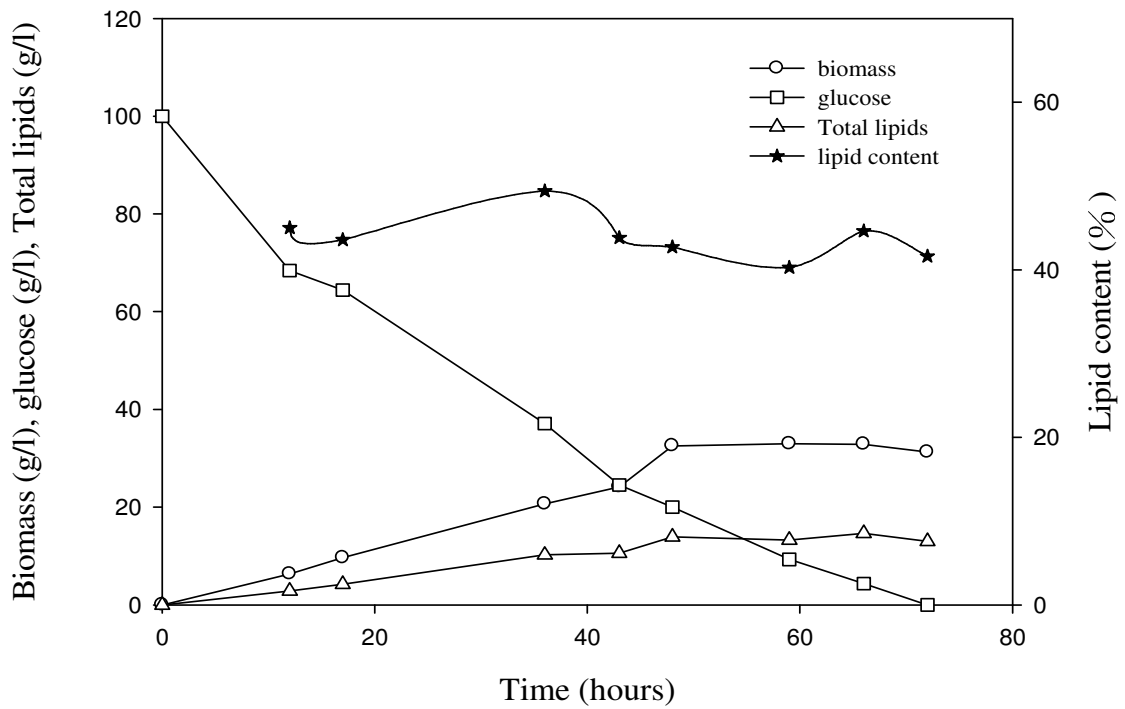


圖 4-13 起始葡萄糖濃度為 100 g/l 之批次發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

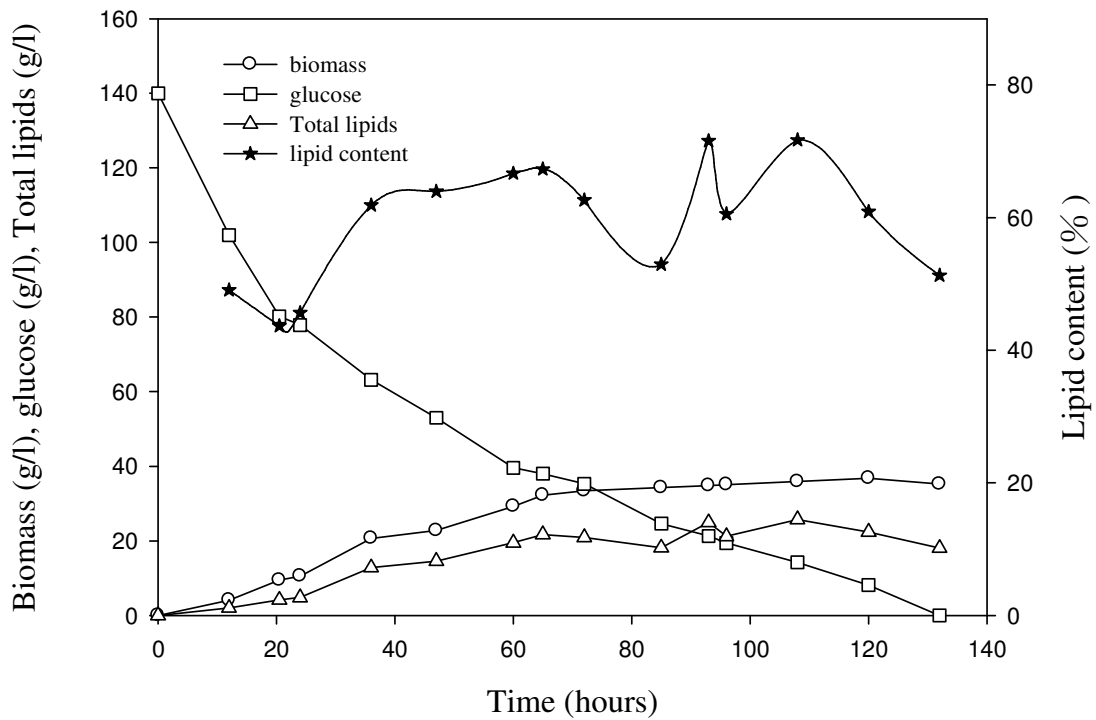


圖 4-14 起始葡萄糖濃度為 140 g/l 之批次發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

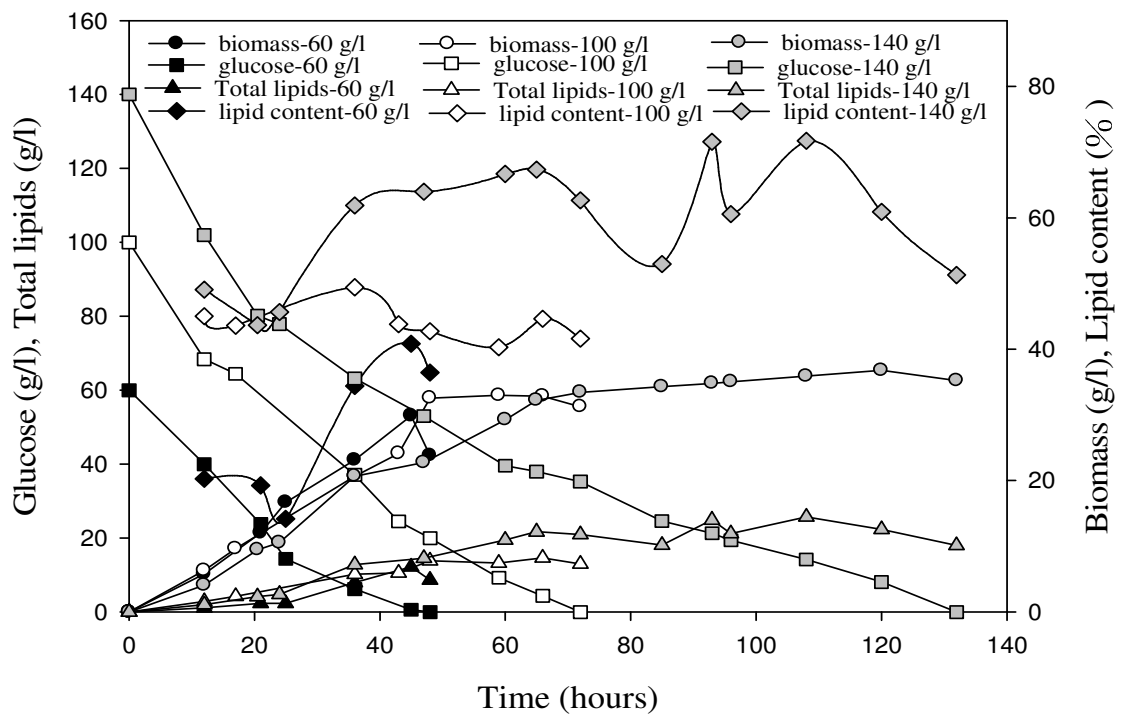


圖 4-15 比較起始葡萄糖濃度為 60 g/l、100 g/l、140 g/l 之批次發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

表 4-19 不同起始 glucose 濃度於批次發酵策略下之動力學參數

Initial concentration of glucose (g/l)	Max. biomass (g/l)	Max. specific growth rate (g/l/hr)	Average lipid content (% w/w)	Max. total lipids (g/l)	Yield* (g/g)	Max. lipid productivity (g/l/hr)
Batch-60 g/l	29.8	0.69	39 ± 3	11.6	0.20	0.27
Batch-100 g/l	32.9	0.68	49 ± 2	16.1	0.17	0.29
Batch-140 g/l	36.2	0.57	62 ± 7	22.4	0.21	0.35

*Lipid produced per glucose consumed.

表 4-20 不同起始 glucose 濃度之脂肪酸組成表

Initial concentration of glucose (g/l)	Relative amount of total fatty acids (% w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Batch-60 g/l	0.8	23.4	0.7	5.6	52.7	13.1	3.8
Batch-100 g/l	0.9	22.6	0.7	5.5	57.7	10.5	2.2
Batch-140 g/l	1.4	20.4	0.8	6.0	54.7	12.7	4.0

4.3.2 控制溶氧量之影響

在搖瓶實驗中發現，溶氧量高低的確會影響菌體的生長與油脂的累積，因此，本次實驗將控制溶氧量於高 DO 值($60 \pm 10\%$)與低 DO 值($25 \pm 10\%$)之批次發酵策略如圖 4-16，來探討此發酵策略對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。而控制溶氧量是不容易地，尤其是維持在高 DO($60 \pm 10\%$)時，為了避免高剪切力對菌體造成傷害，必須補充高純氧，來進行研究，實驗結果如圖 4-17、圖 4-18、圖 4-19 所示，在高 DO 操作下，能使細胞快速生長，最大菌數量達 53.2 g/l，遠高於低 DO 之菌體濃度(36.2 g/l)；但其油脂含量($52 \pm 8\%$)卻明顯少於低 DO 操作($62 \pm 7\%$)，另外值得一提，在低 DO 操作約 72 小時後，細胞即停止生長且油脂也沒有持續累積，當時槽內碳源(葡萄糖)濃度仍豐富約有 40 g/l，因此導致細胞生長受到限制之原因，不能歸咎於缺乏碳源；相反地，限制細胞生長之情形，並沒有在高 DO 控制中發現，究其原因導致細胞生長之差異並不清楚。即使槽內之碳源(葡萄糖)濃度不斷降低至幾乎為零，低 DO 控制之菌體濃度仍不增加。然而，消耗葡萄糖並不會導致更多的脂肪被累積。

高與低 DO 控制之油脂成分差異不大，如表 4-22 所示，其中以油酸(C18:1)與棕梛酸(C16:0)兩者所占的比例最大，分別為 50~60%與 20~30%。即使在高 DO 操作下，可以提高 *R. glutinis* 細胞的生長，但油脂含量仍較低 DO 控制時少，從而導致較低之油脂生產速率，如圖 4-19、表 4-21。

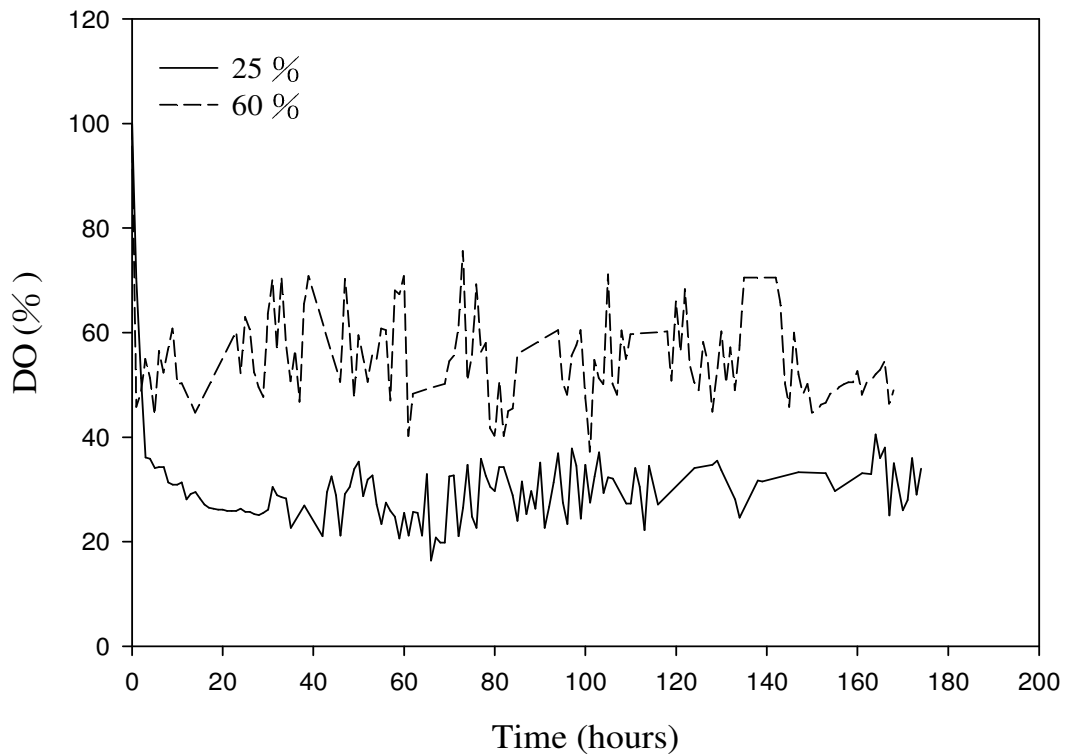


圖 4-16 控制溶氧量在 $25 \pm 10\%$ 、 $60 \pm 10\%$ 之批次發酵 DO (%) 變化情形

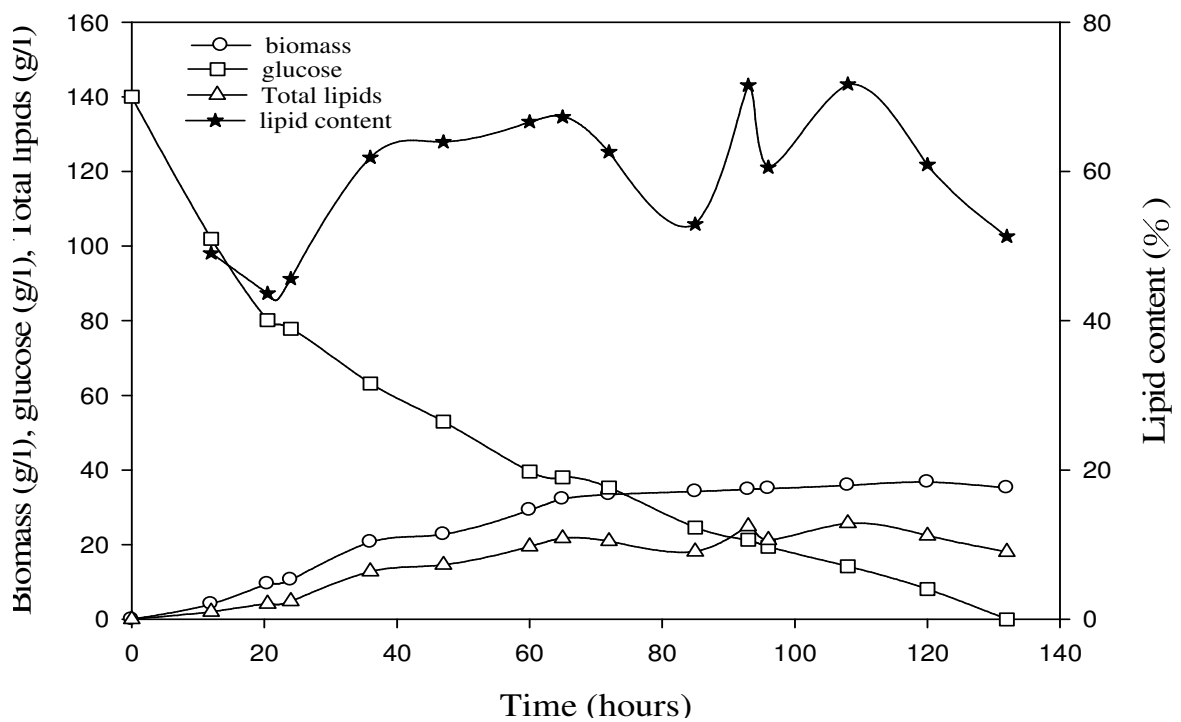


圖 4-17 控制溶氧量在 $25 \pm 10\%$ 之批次發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

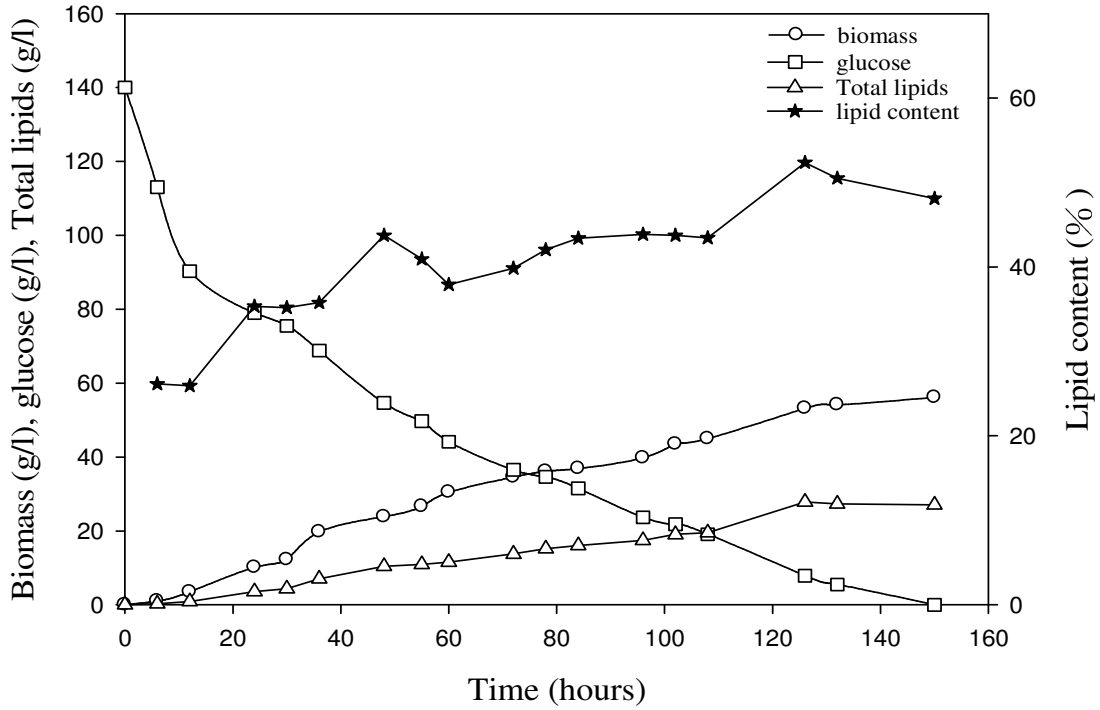


圖 4-18 控制溶氧量在 $60 \pm 10\%$ 之批次發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

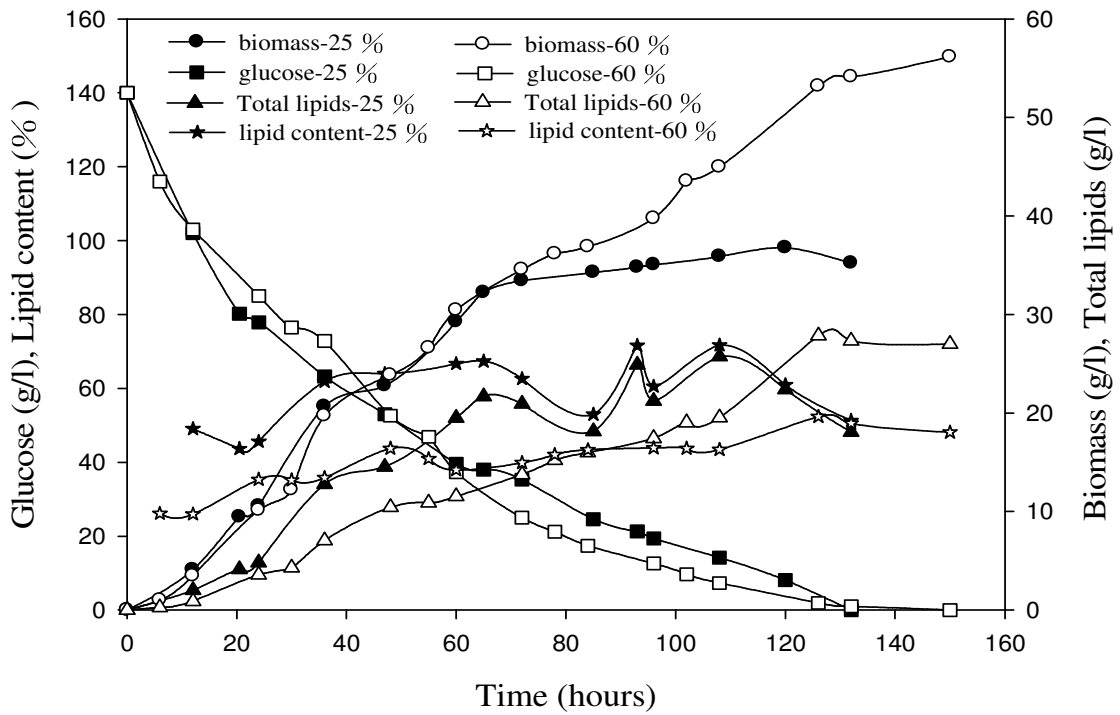


圖 4-19 比較控制溶氧量在 $25 \pm 10\%$ 、 $60 \pm 10\%$ 之批次發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

4.3.2.1 兩階段溶氧量控制之影響

由上述實驗結果得知，低溶氧量能延緩細胞的生長，提高油脂的累積；相反地，高溶氧量可提高細胞的生長，但降低油脂的生產。因此，兩階段溶氧控制策略是最初將 DO 值控制在 $60 \pm 10\%$ 約 70 小時，之後調整到較低 DO 值為 $25 \pm 10\%$ ，直到發酵程序結束。兩階段溶氧控制策略的目的是提供對數生長期，所需之高溶氧($60 \pm 10\%$)，以改善細胞的生長，經過約 70 小時之培養後，降至低溶氧($25 \pm 10\%$)，以提高油脂的累積。

然而，這個策略在油脂累積上並不成功，如圖 4-20、表 4-21 所示，油脂含量並沒有因為溶氧量的調整(從 $60 \pm 10\%$ 至 $25 \pm 10\%$)而得到明顯地改善。兩階段溶氧操作下之最大菌數量為 45.4 g/l，這明顯多於低 DO 之菌數量(36.2 g/l)，但明顯少於高 DO 之菌數量(53.2 g/l)，計算最大油脂生產速率時，兩階段溶氧控制(0.28 g/l/hr)，仍小於低 DO 操作(0.35 g/l/hr)之結果，由此看來，兩階段溶氧控制策略在提高油脂累積方面是不成功地。即使是由圖 4-20 發現在 72 小時調整 DO 值之後，菌數量與油脂含量皆無明顯成長，但低 DO 值培養對油脂累積來說，仍是不錯的控制條件。總而言之，從油脂生產速率與商業化之角度來看，低溶氧控制相較於高溶氧控制將會是首要之選擇。

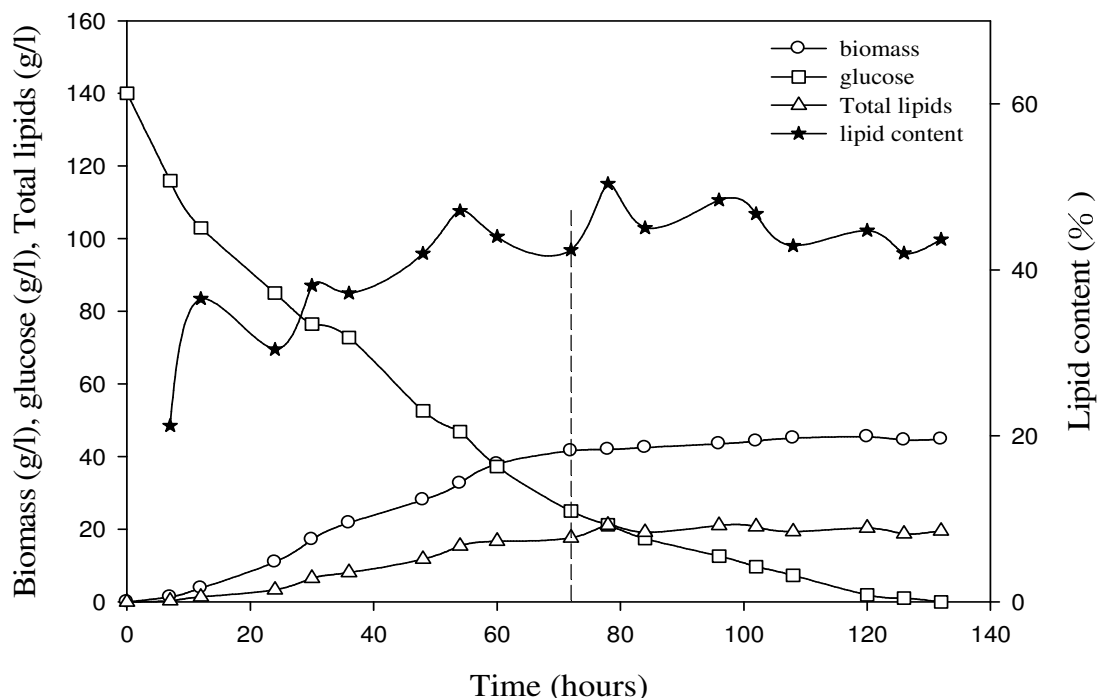


圖 4-20 控制溶氧量於 72 小時前為 $60 \pm 10\%$ ，72 小時後為 $25 \pm 10\%$ 之兩階段批次發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

表 4-21 控制溶氧量於批次發酵策略下之動力學參數

DO level (%)	Max. biomass (g/l)	Max. specific growth rate (g/l/hr)	Average lipid content (% w/w)	Max. total lipids (g/l)	Yield* (g/g)	Max. lipid productivity (g/l/hr)
$25 \pm 10\%$	36.2	0.43	62 ± 7	22.4	0.21	0.35
$60 \pm 10\%$	53.2	0.72	52 ± 8	27.7	0.23	0.24
Two-stage	45.4	0.74	42 ± 3	19.1	0.18	0.28

*Lipid produced per glucose consumed.

表 4-22 控制溶氧量之脂肪酸組成表

DO level (%)	Relative amount of total fatty acids (% w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
$25 \pm 10\%$	1.4	22.6	1.5	4.7	58.1	10.0	1.9

60 ± 10%	1.2	20.1	1.7	6.2	57.0	10.5	3.3
Two-stage	1.3	23.8	0.0	7.1	55.1	9.8	2.9

4.3.3 光強度之影響

在搖瓶實驗中發現，照光下有助於細胞生長，但不利於油脂累積，因此，本次實驗將分別以提供二盞 LED 光源(光強度為 2566.6 $\mu\text{mole/s/m}^2$)、三盞 LED 光源(光強度為 3849.9 $\mu\text{mole/s/m}^2$)與不提供光源之批次發酵策略，來探討光強度對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。實驗結果如圖 4-21、圖 4-22 所示，光強度控制在 3849.9 $\mu\text{mole/s/m}^2$ 下，有較佳之細胞生長速率約為 0.87 g/l/hr，相對地平均葡萄糖消耗速率也較大約為 2.69 g/l/hr，之後則依序為光強度控制在 1283.3 \times 2 $\mu\text{mole/s/m}^2$ 與不提供光源下所獲得之結果。

由圖 4-23、圖 4-24、表 4-23、表 4-24 得知，雖然在提供三盞 LED 光源(光強度為 3849.9 $\mu\text{mole/s/m}^2$)下發酵時，能有較佳之細胞生長速率，且菌數量也能有所增加，但於 96 hr 之後，細胞幾乎停滯生長，推測可能原因是槽內有抑制菌體成長之物質存在或著是槽內缺乏菌體生長所需的營養物質(如氮源等)，整體上來看，以光強度控制在 3849.9 $\mu\text{mole/s/m}^2$ 下，較有助於油脂生產，其油脂生產速率較高約為 0.34 g/l/hr，相信能利用饋料的方式，去提高油脂含量，進而使油脂生產速率能再次上升。

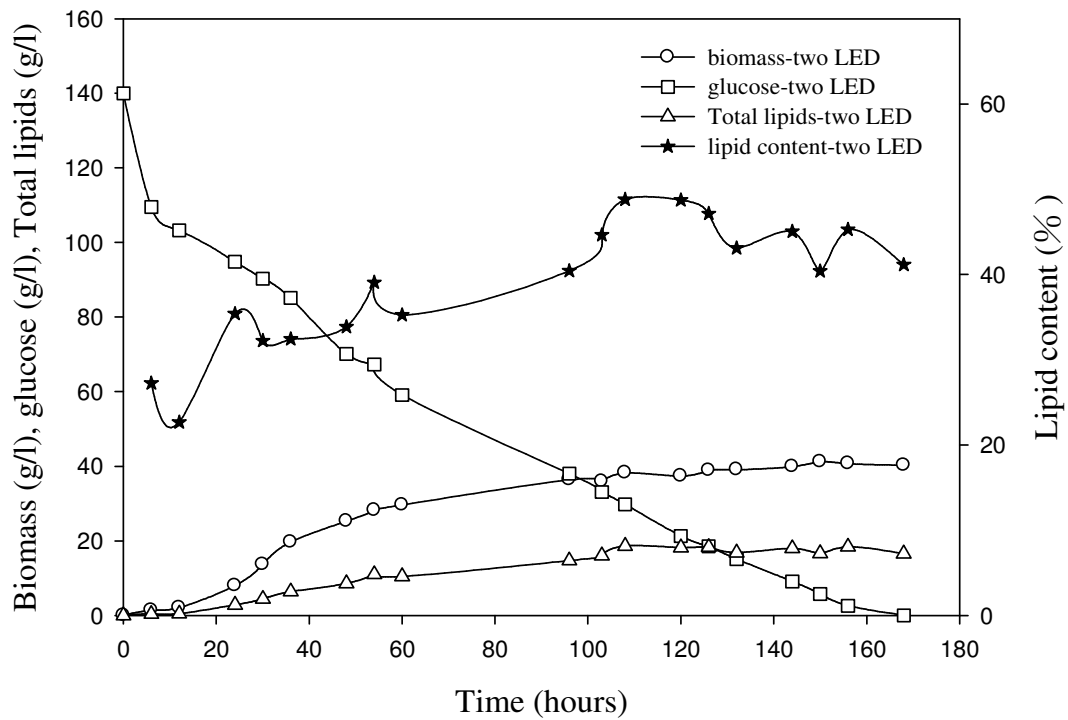


圖 4-21 提供二盞 LED 燈(光強度為 $2566.6 \mu \text{mole/s/m}^2$)之批次發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

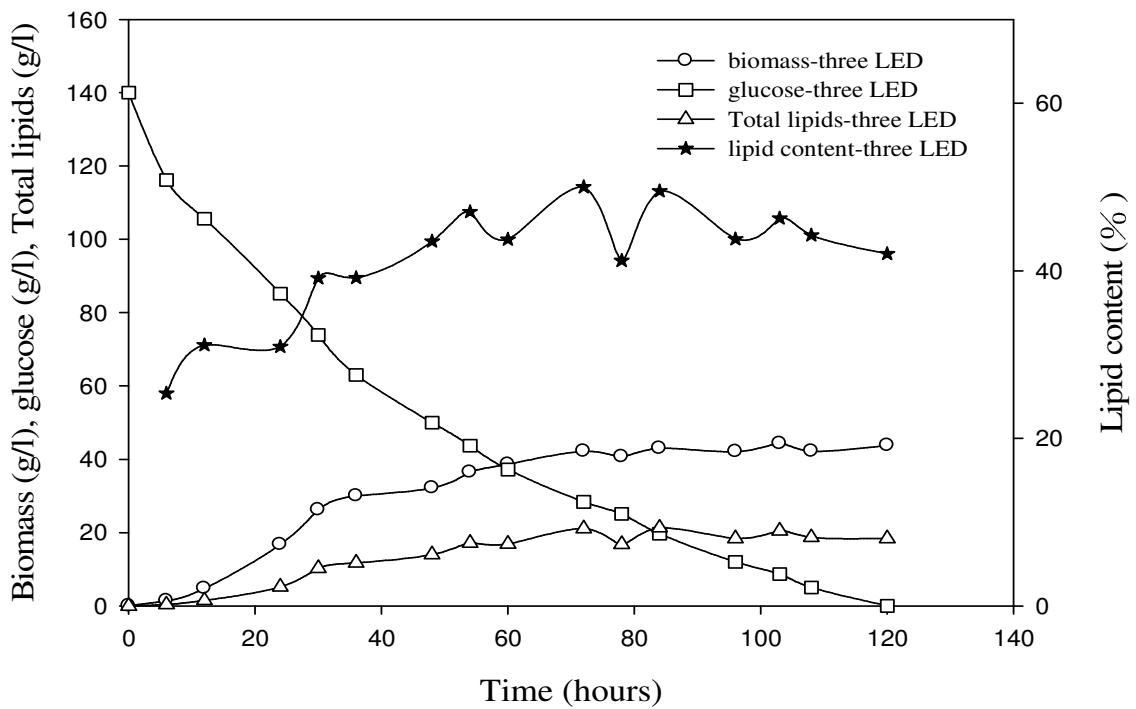


圖 4-22 提供三盞 LED 燈(光強度為 $3849.9 \mu \text{ mole/s/m}^2$)之批次發酵策略下, *R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

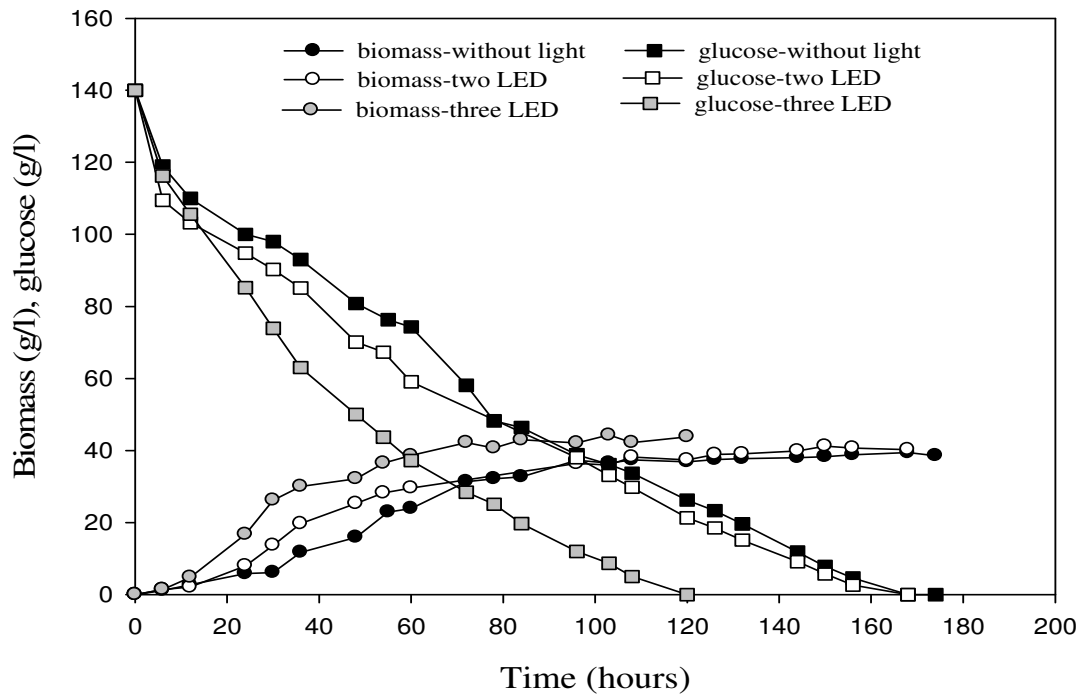


圖 4-23 比較不提供光源與提供二盞 LED 燈(光強度為 $2566.6 \mu \text{ mole/s/m}^2$)、三盞 LED 燈(光強度為 $3849.9 \mu \text{ mole/s/m}^2$)之批次發酵策略下, *R. glutinis* 生長之變化

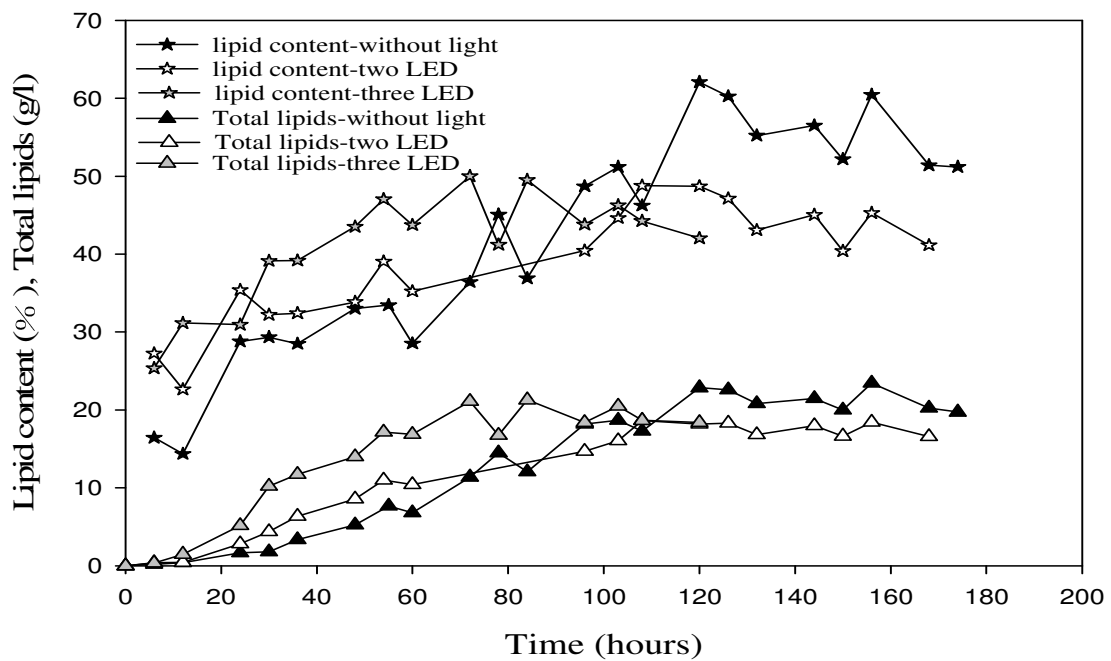


圖 4-24 比較不提供光源與提供二盞 LED 燈(光強度為 $2566.6 \mu \text{ mole/s/m}^2$)、三

蓋 LED 燈(光強度為 3849.9 μ mole/s/m²)之批次發酵策略下, *R. glutinis* 累積油脂之變化

表 4-23 探討光強度於批次發酵策略下之動力學參數

Light intensity	Max. biomass (g/l)	Max. specific growth rate (g/l/hr)	Average glucose consumption rate (g/l/hr)	Average lipid content (% w/w)	Max. total lipids (g/l)	Yield* (g/g)	Max. lipid productivity (g/l/hr)
No light Batch	39.4	0.43	2.07	62.1 ± 4	23.5	0.20	0.19
2-LED batch	41.2	0.55	2.45	48.8 ± 2	18.4	0.17	0.20
3-LED batch	44.3	0.87	2.69	49.5 ± 3	21.3	0.18	0.34

*Lipid produced per glucose consumed.

表 4-24 探討光強度之脂肪酸組成表

Light intensity	Relative amount of total fatty acids (% w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
No light batch	1.3	24.1	0.3	5.2	56.3	10.1	2.6
2-LED batch	1.2	20.8	0.6	4.4	55.9	15.1	1.9
3-LED batch	1.4	22.6	1.5	4.7	58.1	9.8	1.9

4.4 攪拌式發酵槽饋料批次程序 (fed-batch)

4.4.1 控制碳源濃度之影響

為了提高菌數量和油脂的累積，故採取饋料策略為控制饋料流速以維持葡萄糖濃度在 10 ± 2 g/l、 20 ± 4 g/l、 30 ± 5 g/l，來探討此發酵策略對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。而饋料批次的起始濃度定為 60 g/l，其是因為在批次發酵槽實驗中可發現，60 g/l 之起始葡萄糖濃度有著較好的細胞生長速率 (0.69 g/l/hr)。以 500 g/l 葡萄糖為饋料之碳源，當葡萄糖濃度下降至設定濃度時，開始進行饋料控制直至油脂發酵達穩定。而在葡萄糖維持在 10 ± 2 g/l、 20 ± 4 g/l、 30 ± 5 g/l 策略中，其整體葡萄糖饋料重分別為 118、168、209 克。實驗結果如圖 4-25、圖 4-26、圖 4-27 所示，在饋料批次葡萄糖維持在 10 ± 2 g/l、 20 ± 4 g/l、 30 ± 5 g/l 時，其平均油脂含量分別為 36.3%、53.0%、56.0%；其最大菌體濃度分別為 36.0、41.0、32.8 g/l；其最大油脂生產速率分別為 0.20、0.27、0.24 g/l/hr。

由圖 4-28、表 4-25、表 4-26 可得知以葡萄糖維持在 10 ± 2 g/l、 20 ± 4 g/l 時，有較佳之細胞生長速率，兩者皆為 0.78 g/l/hr，且菌體濃度也較維持在 30 ± 5 g/l 來得高，但平均油脂含量卻低於維持在 30 ± 5 g/l 時，推測是菌體必須在較高碳源濃度之環境下，才能更有效地去累積油脂，整體上來看，是以饋料批次葡萄糖維持在 20 ± 4 g/l 時，較有利於油脂的生產，其生產速率為 0.27 g/l/hr。

相較於以起始葡萄糖濃度為 140 g/l 之批次發酵策略來說，其油脂生產速率

仍較低，但對於提升細胞生長速率來說，卻是有不錯之進展。

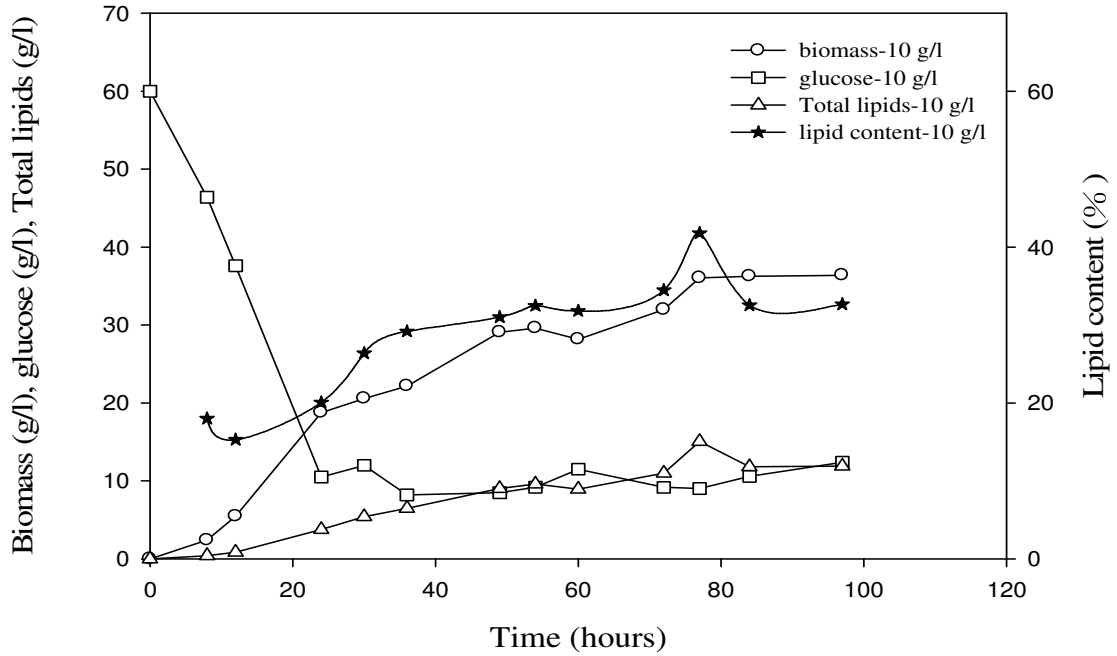


圖 4-25 控制葡萄糖濃度在 10 ± 2 g/l 之饋料批次發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

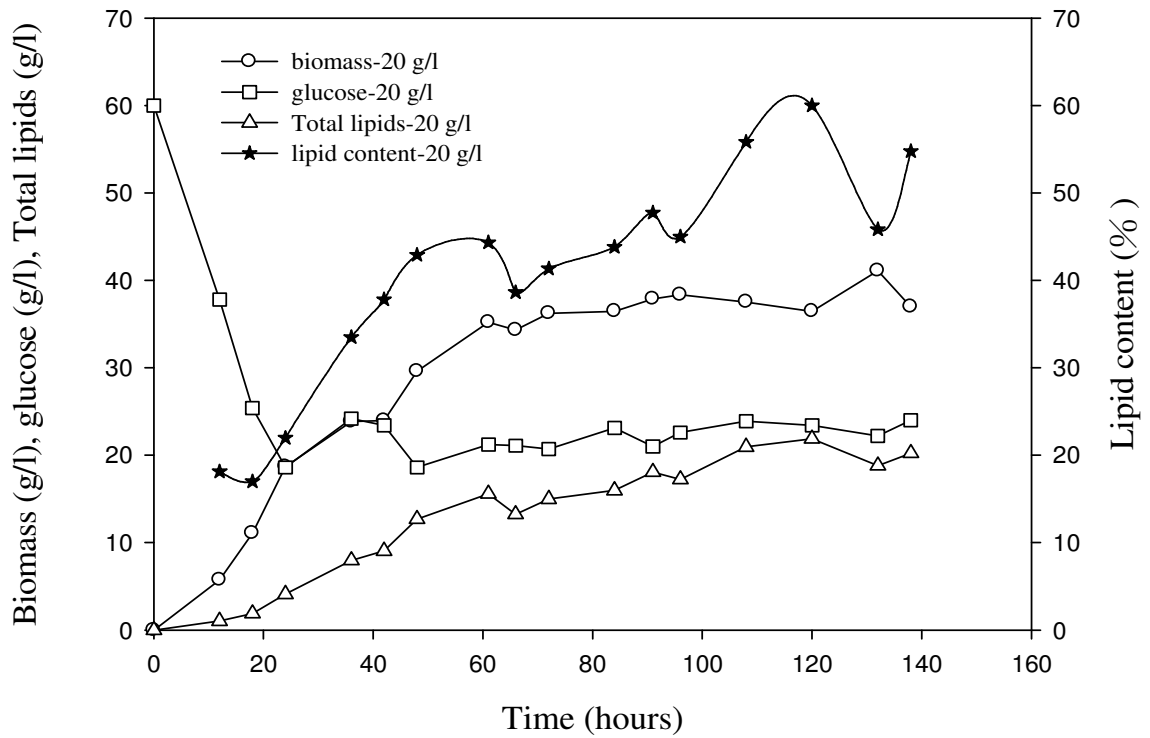


圖 4-26 控制葡萄糖濃度在 20 ± 4 g/l 之饋料批次發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

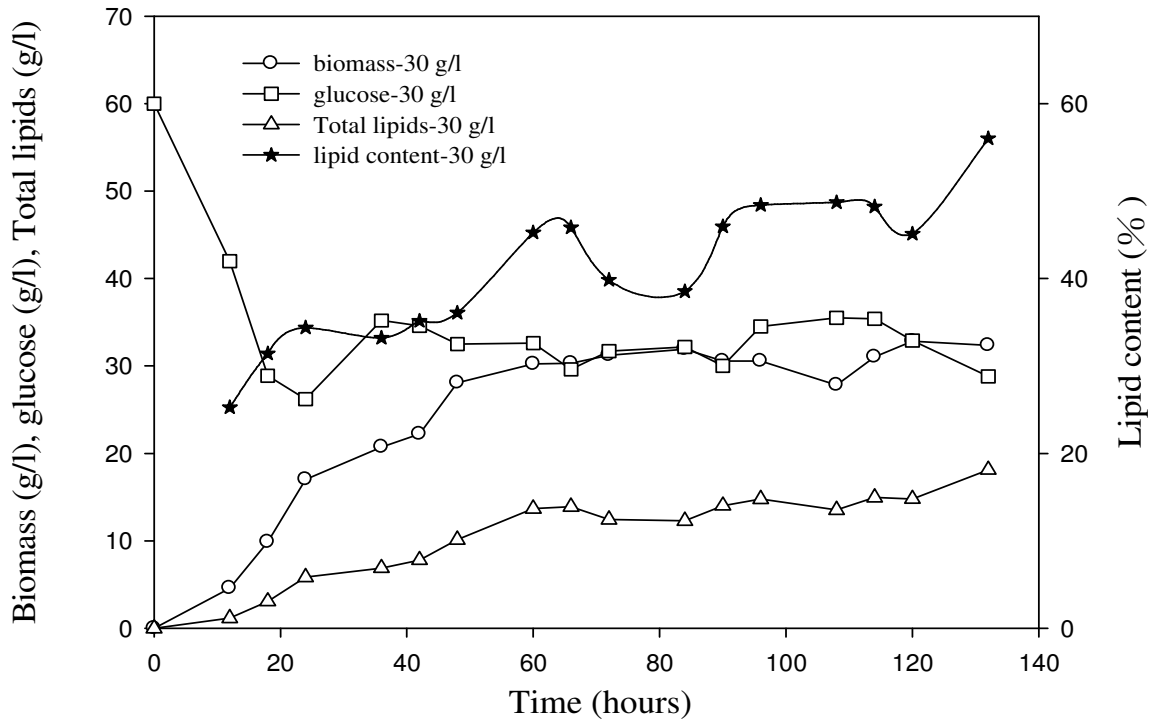


圖 4-27 控制葡萄糖濃度在 30 ± 5 g/l 之饋料批次發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

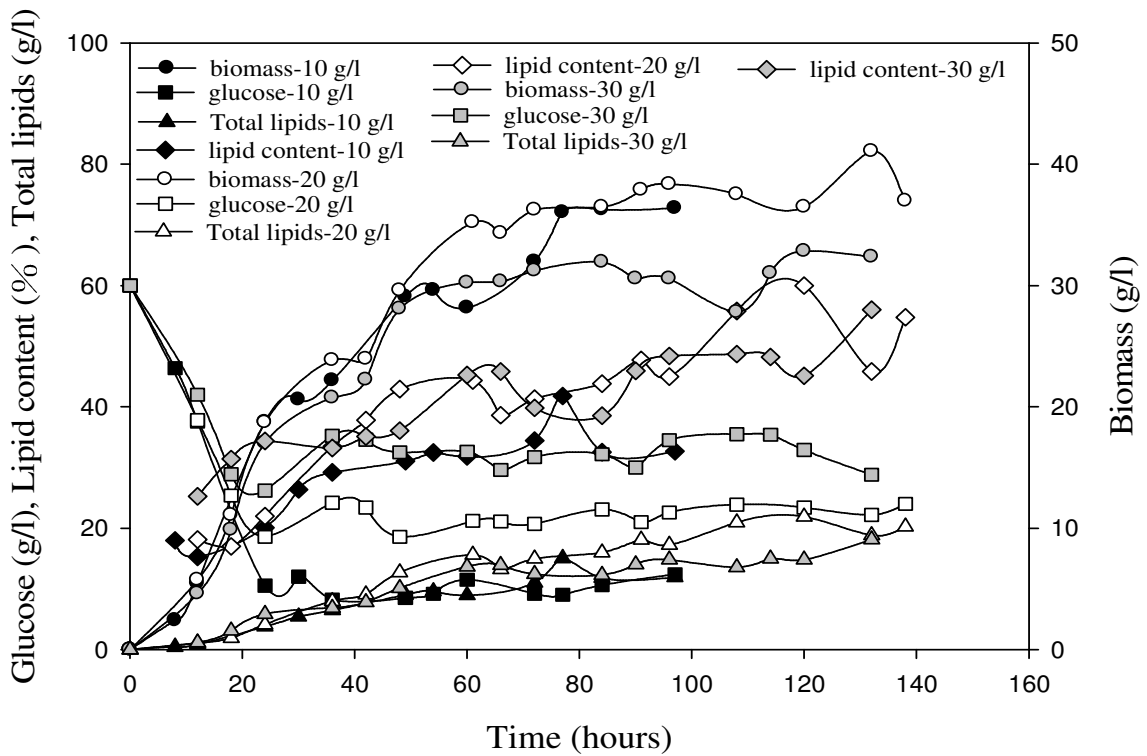


圖 4-28 比較控制葡萄糖濃度在 10 ± 2 g/l、 20 ± 4 g/l、 30 ± 5 g/l 之饋料批次發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

表 4-25 控制 glucose 濃度於饋料批次發酵策略下之動力學參數

Control concentration of glucose (g/l)	Max. biomass (g/l)	Max. specific growth rate (g/l/hr)	Average lipid content (% w/w)	Max. total lipids (g/l)	Yield* (g/g)	Max. lipid productivity (g/l/hr)
Fed-batch at 10 ± 2 g/l	36.0	0.78	36.3	13.1	0.16	0.20
Fed-batch at 20 ± 4 g/l	41.0	0.78	53.0	21.7	0.23	0.27
Fed-batch at 30 ± 5 g/l	32.8	0.71	56.0	18.4	0.21	0.24

*Lipid produced per glucose consumed.

表 4-26 控制 glucose 濃度之脂肪酸組成表

Control concentration of glucose (g/l)	Relative amount of total fatty acids (% w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Fed-batch at 10 ± 2 g/l	1.0	24.2	0.7	5.7	52.6	11.5	4.4
Fed-batch at 20 ± 4 g/l	0.9	23.3	0.6	6.2	54.4	11.9	2.8
Fed-batch at 30 ± 5 g/l	0.9	22.3	0.8	6.5	55.5	11.6	2.7

4.4.2 兩階段溶氧量搭配單次饋料之實驗

由批次兩階段溶氧量控制之實驗得知，在初期提高溶氧量($60 \pm 10\%$)，的確能提高細胞生長速率，且菌數量也有所增加；但在調整溶氧量($25 \pm 10\%$)之後，油脂含量卻無明顯增加。有文獻指出，油脂性微生物必須在高碳氮比(C/N ratio)的條件下，才能有效地去累積油脂，因此，本次實驗將於調整溶氧量的時間點(72 hr)上，以 500 g/l 葡萄糖為饋料之碳源，同時進行單次饋料，使槽內之葡萄糖濃度上升至約 60 g/l，來探討兩階段溶氧量搭配單次饋料策略對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。實驗結果如圖 4-29、圖 4-30、表 4-27、表 4-28 所示，透過營造低溶氧且較高碳源濃度之環境，成功地改善兩階段溶氧量操作下，後段碳源濃度不足所造成油脂無法繼續累積等問題，使平均油脂含量能提高約 28.6%，獲得較佳之油脂濃度約為 28.5 g/l。

此策略除了實現同時提高細胞生長速率(0.74 g/l/hr)與油脂生產速率(0.35 g/l/hr)之優點外，也降低了對純氧的需求，另外得知，可以利用饋料碳源的方式，去改善油脂之累積，進而提高油脂生產。

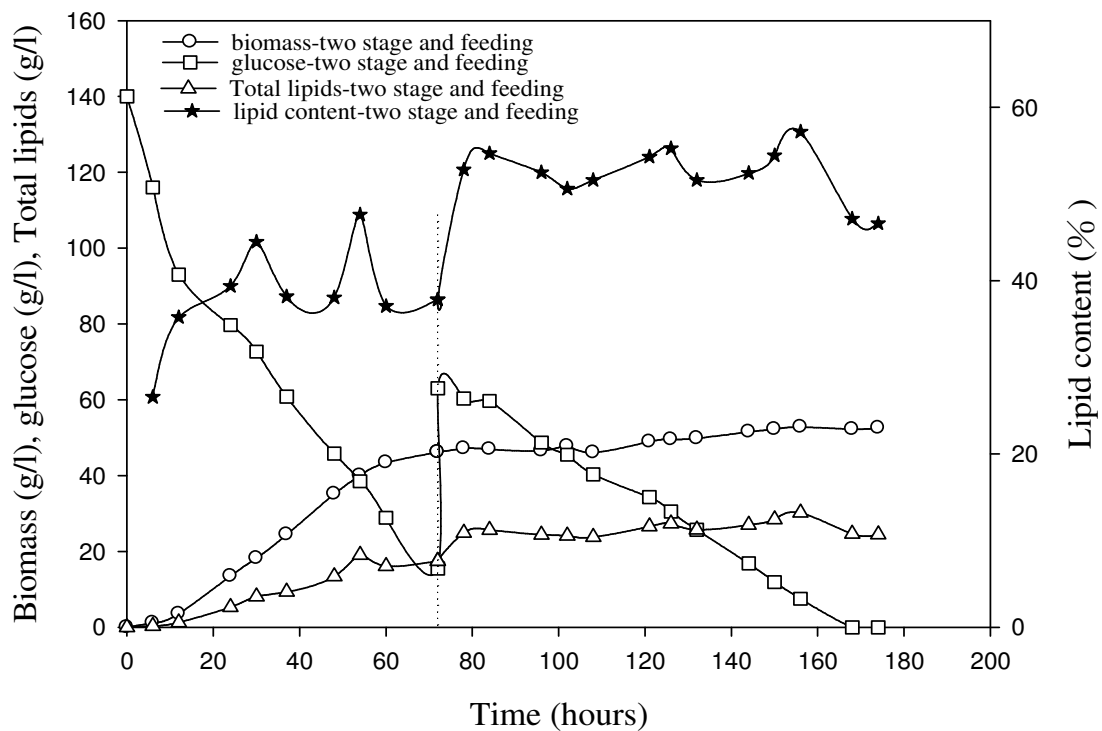


圖 4-29 兩階段溶氧搭配單次饋料批次發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

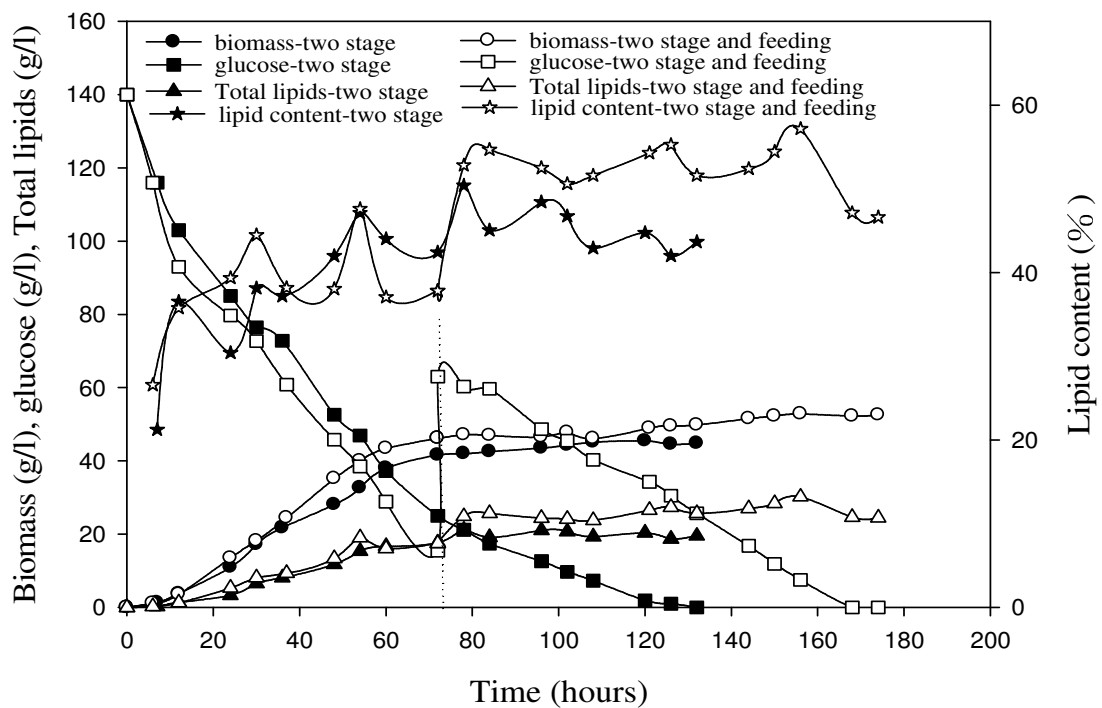


圖 4-30 比較兩階段溶氧批次發酵策略與兩階段溶氧搭配單次饋料批次發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

表 4-27 兩階段溶氧批次發酵策略與兩階段溶氧搭配單次饋料批次發酵策略下之動力學參數

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/l)	Max. specific growth rate (g/l/hr)	Average lipid content (% w/w)	Max. total lipids (g/l)	Yield* (g/g)	Max. lipid productivity (g/l/hr)
Two-stage batch	45.4	0.74	42 ± 3	19.1	0.18	0.28
Two-stage fed-batch	52.8	0.74	54 ± 2	28.5	0.21	0.35

*Lipid produced per glucose consumed.

表 4-28 兩階段溶氧批次發酵策略與兩階段溶氧搭配單次饋料批次發酵策略之脂肪酸組成表

Fermentation Strategy	Relative amount of total fatty acids (% w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Two-stage batch	1.3	23.8	0.0	7.1	55.1	9.8	2.9
Two-stage fed-batch	1.3	25.7	0.6	4.9	54.6	10.7	2.2

4.4.3 提供三盞 LED 光源搭配連續饋料之實驗

由批次光強度控制之實驗得知，以光強度控制在 $3849.9 \mu\text{mole/s/m}^2$ 下，有較佳之細胞生長速率 (0.87 g/l/hr) 與油脂生產速率 (0.34 g/l/hr)，但隨著光強度的增加，油脂含量卻是下降地，因此，本此實驗將於培養至 72 hr 時，以 500 g/l 葡萄糖為饋料之碳源，進行連續饋料來維持槽內之葡萄糖濃度為 $30 \pm 2 \text{ g/l}$ ，希望透過此發酵策略來改善油脂的累積，進而提高油脂生產速率。

實驗結果如圖 4-31、圖 4-32、表 4-29、表 4-30 所示，經由連續饋料來維持碳源(葡萄糖)濃度下，油脂含量能從無饋料時之 49.5% 上升至 58.6%，大約提高了 18.4%，而總油脂濃度從無饋料時之 21.3 g/l 上升至 24.6 g/l ；最大油脂生產速率也從無饋料之 0.34 g/l/hr 上升至 0.39 g/l/hr 。綜合本次實驗與批次光強度控制之實驗結果得知，倘若能改善 72 小時之後，細胞停止生長的狀況，並探討出最佳饋料之碳源濃度與最佳饋料之時間點，相信油脂生產速率將會再有所提升。

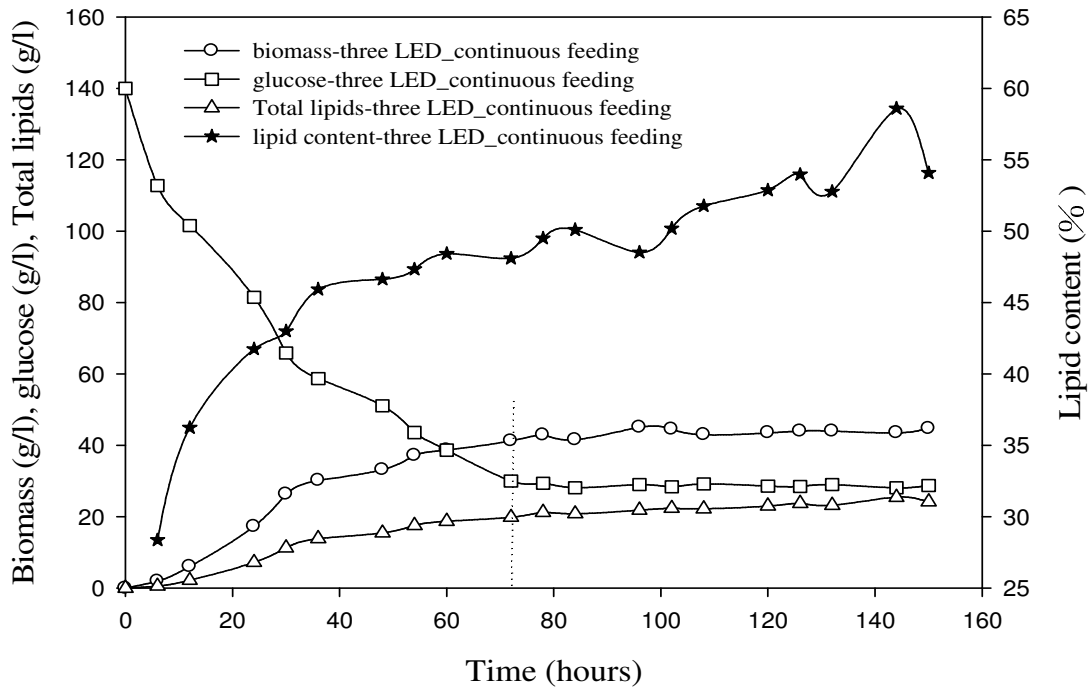


圖 4-31 提供三盞 LED 燈(光強度為 $3849.9 \mu \text{mole/s/m}^2$) 搭配連續饋料批次控制葡萄糖濃度在 $30 \pm 2 \text{ g/l}$ 發酵策略下, *R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

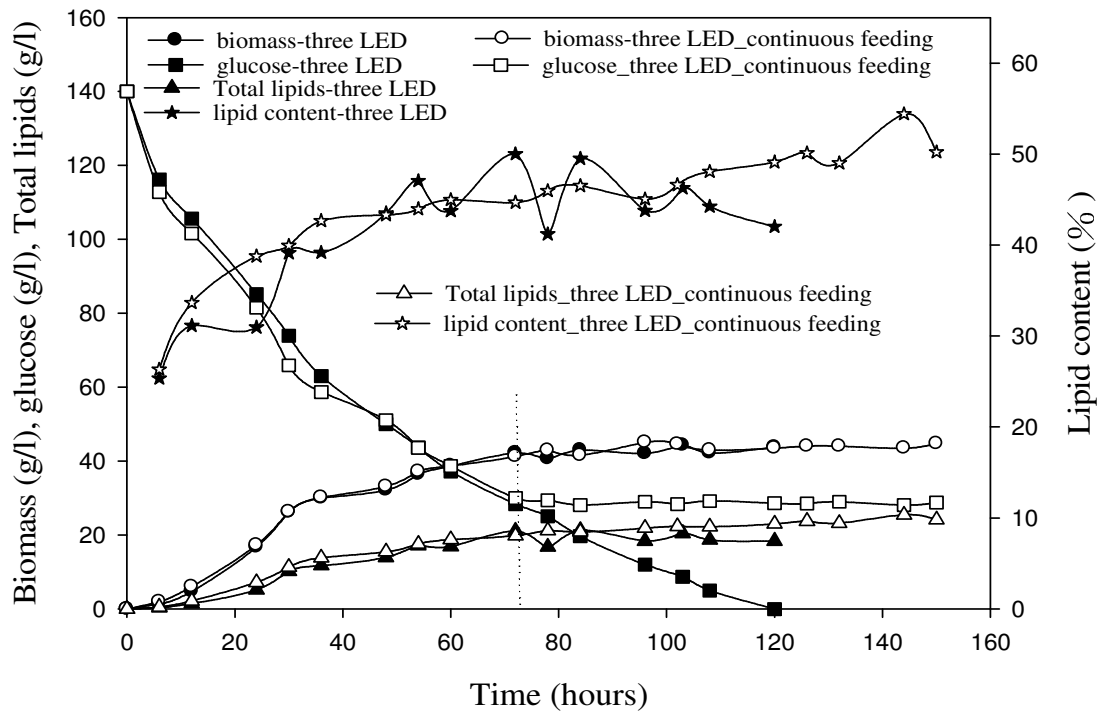


圖 4-32 比較提供三盞 LED 燈(光強度為 $3849.9 \mu \text{mole/s/m}^2$) 之批次發酵策略與

三盞 LED 燈(光強度為 3849.9 μ mole/s/m²)搭配連續饋料批次控制葡萄糖濃度在 30 \pm 2 g/l 發酵策略下，*R. glutinis* 生長及累積油脂之變化

表 4-29 提供三盞 LED 燈之批次發酵策略與提供三盞 LED 燈搭配連續饋料批次發酵策略下之動力學參數

Light intensity	Max. biomass (g/l)	Max. specific growth rate (g/l/hr)	Average glucose consumption rate (g/l/hr)	Average lipid content (% w/w)	Max. total lipid (g/l)	Yield* (g/g)	Max. lipid productivity (g/l/hr)
Three LED batch	44.3	0.87	2.69	49.5 \pm 3	21.9	0.18	0.34
Three LED fed-batch at 30 g/l	45.1	0.88	2.79	54.5 \pm 2	24.6	0.19	0.39

*Lipid produced per glucose consumed.

表 4-30 提供三盞 LED 燈之批次發酵策略與提供三盞 LED 燈搭配連續饋料批次發酵策略下之脂肪酸組成表

Fermentation Strategy	Relative amount of total fatty acids (% w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Three LED batch	1.4	22.6	1.5	4.7	58.1	9.8	1.9
Three LED fed-batch at 30 g/l	1.4	25.5	0.7	4.7	54.6	10.9	2.3

4.5 發酵策略之比較

表 4-31、表 4-32 分別為各發酵策略之動力學參數整理與脂肪酸組成之整理，在批次(改變起始葡萄糖濃度、溶氧量控制、光強度控制條件)與饋料批次(改變葡萄糖濃度、兩階段溶氧控制、三盞 LED 光源)策略中，以發酵策略為兩階段溶氧搭配單次饋料與三盞 LED 光源搭配連續饋料能獲得較佳之結果，推測其原因在於兩階段溶氧搭配單次饋料策略，可以提供對數生長期時所需的高溶氧，以獲得高細胞生長速率(0.74 g/l/hr)且較高的菌數量(52.8 g/l)，之後再透過降低溶氧及饋料的方式，能促使細胞穩定的累積油脂(54%)，且提高了整體油脂生產速率(0.35 g/l/hr)；而三盞 LED 光源搭配連續饋料策略，據推測是 *R. glutinis* 能透過照光的方式，去改善細胞內蛋白質合成途徑，進而提高細胞生長速率(0.88 g/l/hr)，之後再利用饋料的方式，來促使細胞穩定的累積油脂(54.5%)，以提高整體油脂生產速率(0.39 g/l/hr)。

從油脂生產速率與商業化角度來看，以三盞 LED 光源搭配連續饋料策略較兩階段溶氧搭配單次饋料策略能利於後續的發展與研究，其原因為三盞 LED 光源搭配連續饋料策略，除了在控制上較簡單外，最主要就是此策略能以照光的形式代替高溶氧環境，來提高細胞生長速率，因此，對純氧的需求相較於兩階段溶氧搭配單次饋料策略少了許多，大幅降低成本。

在各發酵策略中，其油脂成分差異不大，其中以油酸(C18:1)與棕櫚酸(C16:0)

兩者所占的比例最大，分別為 50~60%與 20~30%。

表 4-33、表 4-34 為 *Rhodotorula glutinis* 文獻結果與本研究最佳之成果做比較。

由比較結果可以得知，本研究之菌體油脂含量皆高出文獻結果許多，推測原因在於本研究採較高起始碳源濃度相對較低起始氮源濃度之培養條件與饋料純碳源(葡萄糖)等，來進行實驗有關，但低氮源濃度的環境，卻是不利於細胞去合成蛋白質、核酸等物質，進而影響到菌體生長，因此，本研究之菌數量相較於文獻中採富氧空氣饋料發酵液(葡萄糖、酵母萃取物、含水硫酸鎂)策略上低了很多。

表 4-31 各實驗之動力學參數整理

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/l)	Max. specific growth rate (g/l/hr)	Average lipid content (% w/w)	Max. total lipids (g/l)	Yield* (g/g)	Max. lipid productivity (g/l/hr)
Batch-60 g/l	29.8	0.69	39.0 ± 3	11.6	0.20	0.27
Batch-100 g/l	32.9	0.68	49.0 ± 2	16.1	0.17	0.29
Batch-140 g/l	36.2	0.57	62.0 ± 7	22.4	0.21	0.35
Batch-25 ± 10%	36.2	0.57	62.0 ± 7	22.4	0.21	0.35
Batch-60 ± 10%	53.2	0.72	52.0 ± 8	27.7	0.23	0.24
Batch-Two stage	45.4	0.74	42.0 ± 3	19.1	0.18	0.28
Batch- No light	39.4	0.43	62.1 ± 4	24.5	0.20	0.19
Batch- 2-LED	41.2	0.55	48.8 ± 2	20.1	0.17	0.20
Batch- 3-LED	44.3	0.87	49.5 ± 3	21.9	0.18	0.34
Fed-batch at 10 g/l	36.0	0.78	36.3 ± 5	13.1	0.16	0.20
Fed-batch at 20 g/l	41.0	0.78	53.0 ± 6	21.7	0.23	0.27
Fed-batch at 30 g/l	32.8	0.71	56.0 ± 5	18.4	0.21	0.24
Batch-Two stage	45.4	0.74	42.0 ± 3	19.1	0.18	0.28
Fed-batch Two-stage	52.8	0.74	54.0 ± 2	28.5	0.21	0.35
Batch-3-LED	44.3	0.87	49.5 ± 3	21.9	0.18	0.34
Fed-batch 3-LED at 30 g/l	45.1	0.88	54.5 ± 2	24.6	0.19	0.39

*Lipid produced per glucose consumed.

表 4-32 各實驗之脂肪酸組成整理

Fermentation Strategy	Relative amount of total fatty acids (% , w/w)						
	C 14:0	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3
Batch-60 g/l	0.8	23.4	0.7	5.6	52.7	13.1	3.8
Batch-100 g/l	0.9	22.6	0.7	5.5	57.7	10.5	2.2
Batch-140 g/l	1.4	20.4	0.8	6.0	54.7	12.7	4.0
Batch-25 ± 10%	1.4	22.6	1.5	4.7	58.1	10.0	1.9
Batch-60 ± 10%	1.2	20.1	1.7	6.2	57.0	10.5	3.3
Batch-Two stage	1.3	23.8	0.0	7.1	55.1	9.8	2.9
Batch- No light	1.3	24.1	0.3	5.2	56.3	10.1	2.6
Batch- 2-LED	1.2	20.8	0.6	4.4	55.9	15.1	1.9
Batch- 3-LED	1.4	22.6	1.5	4.7	58.1	9.8	1.9
Fed-batch at 10 g/l	1.0	24.2	0.7	5.7	52.6	11.5	4.4
Fed-batch at 20 g/l	0.9	23.3	0.6	6.2	54.4	11.9	2.8
Fed-batch at 30 g/l	0.9	22.3	0.8	6.5	55.5	11.6	2.7
Batch-Two stage	1.3	23.8	0.0	7.1	55.1	9.8	2.9
Fed-batch Two stage	1.3	25.7	0.6	4.9	54.6	10.7	2.2
Batch-3-LED	1.4	22.6	1.5	4.7	58.1	9.8	1.9
Fed-batch 3-LED at 30 g/l	1.4	25.5	0.7	4.7	54.6	10.9	2.3

表 4-33 *Rhodotorula glutinis* 文獻與本研究成果比較(I)

Fermentation Strategy	Carbon source	Nitrogen Source	Feeding solution components	Max. biomass (g/l)	Average lipid content (% , w/w)	Reference
Fed-batch using oxygen-enriched air	Glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄ and Yeast Extract	Glucose Yeast Extract MgSO ₄ · 7H ₂ O	185	40	(Jae Gu Pan, et al., 1986)
Fed-batch using glucose feedback addition	Glucose	MSG* wastewater	Glucose	36.6	20	(Feiyan Xue, et al., 2008)
Fed-batch	Crude glycerol	(NH ₄) ₂ SO ₄ and Yeast Extract	Glycerol (NH ₄) ₂ SO ₄	10.0	60.7	(Chanika Saenge, et al., 2011)
Batch	Glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄ and Yeast Extract	-----	36.2	62	This Study
Fed-batch using two-stage	Glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄ and Yeast Extract	Glucose	52.8	54	This Study
Fed-batch at 30 g/l with three LED	Glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄ and Yeast Extract	Glucose	45.1	54.5	This Study

*MSG: monosodium glutamate.

表 4-34 *Rhodotorula glutinis* 文獻與本研究成果比較(II)

Fermentation Strategy	Yield* (g/g)	Max. lipid productivity (g/l/hr)	Reference
Fed-batch using oxygen-enriched air	-----	0.88	(Jae Gu Pan, et al., 1986)
Fed-batch using glucose feedback addition	0.24	0.05	(Feiyan Xue, et al., 2008)
Fed-batch	0.03	0.12	(Chanika Saenge, et al., 2011)
Batch	0.21	0.35	This Study
Fed-batch using two-stage	0.21	0.35	This Study
Fed-batch at 30 g/l with three LED	0.19	0.39	This Study

*Lipid produced per glucose consumed.

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

由上章節討論中，了解到培養時間、起始葡萄糖濃度、氮源濃度、溶氧量、溫度、光源之影響以及各種發酵策略探討之結果，整理出以下幾點結論：

1. 由 *R. glutinis* 之脂肪酸分析結果與培養時間(0~96 hr)之影響得知，*R. glutinis* 細胞內所含的油脂成分，以油酸(C18:1)占 50~60%、棕櫚酸(C16:0)占 20~30%為主；搖瓶批次培養 24 hr 期間，pH 值會從起始 5.5 迅速降至 2 左右，將影響到菌體生長與累積油脂。
2. 由不同碳源(葡萄糖、糖蜜、甘油、水溶性澱粉)、起始碳源濃度(15 g/l、30 g/l、45 g/l、60 g/l)、起始氮源濃度(2 g/l、4 g/l、6 g/l、8 g/l、10 g/l、12 g/l)之影響得知，以葡萄糖當作碳源，較能有效生產油脂，除了較易被菌體代謝與吸收外，在代謝路徑上也較易提供合成油脂時所需的 NADPH；隨著起始葡萄糖濃度的增加，菌體濃度與油脂含量也會隨之增加；而隨著起始氮源濃度的增加，很明顯地油脂含量與油脂濃度會隨之下降，這和文獻上油脂性微生物累積油脂之條件相符合。
3. 由改變發酵液體積平底(30 ml、40 ml、50 ml)及檔板(50 ml)、改變轉速(60 rpm、150 rpm、210 rpm)、兩階段改變轉速之影響得知，高 DO 值會導致菌體迅速增長，但會降低油脂的含量；低 DO 值會延緩細胞的生

長，但有較高的油脂含量。

4. 由不同溫度下(18°C、24°C、27°C、30°C)、照光與不照光(暗室)之影響得知，以 24°C 為培養溫度下，能有較高之油脂含量且菌數量也高，因此，選定 24°C 為後續之培養溫度；照光將有助於提高菌體的生長，但不利於油脂的累積，推測是微生物可以透過照光的方式，去改變其體內蛋白質合成的途徑，進而間接地影響到菌體的生長與代謝產物的生成。
5. 由起始葡萄糖濃度(60 g/l、100 g/l、140 g/l)批次與控制葡萄糖濃度(10 ± 2 g/l、20 ± 4 g/l、30 ± 5 g/l)饋料批次發酵策略得知，以起始葡萄糖濃度為 140 g/l 批次培養下，並不會對菌體生長產生抑制現象；而控制葡萄糖濃度培養下，將有助於提高細胞生長速率，兩者相比較，以起始葡萄糖濃度為 140 g/l 批次培養下，有較佳之油脂含量(62%)與較佳之油脂生產速率(0.35 g/l/hr)。
6. 由批次溶氧量控制、批次兩階段溶氧量控制、兩階段溶氧量搭配單次饋料批次發酵策略得知，批次高 DO 值(60 ± 10%)控制，能使細胞快速生長，最大菌數量達 53.2 g/l，遠多於批次低 DO 值(25 ± 10%)控制之菌體濃度(36.2 g/l)，而批次高 DO 值控制之油脂含量(52 ± 8%)明顯少於批次低 DO 值控制之油脂含量(62 ± 7%)；批次兩階段溶氧量控制策略，在油脂累積上並不成功，油脂含量並沒有因為溶氧量的調整(從 60 ± 10% 至 25 ± 10%)而得到明顯地改善；兩階段溶氧量搭配單次饋料策略除了

實現同時提高細胞生長速率(0.74 g/l/hr)與油脂生產速率(0.35 g/l/hr)之優點外，也降低了對純氧的需求。

7. 由批次光強度控制、提供三盞 LED 光源搭配連續饋料發酵策略得知，以光強度控制在 $3849.9 \mu\text{mole/s/m}^2$ 下，有較佳之細胞生長速率約為 0.87 g/l/hr，且油脂生產速率也較高約為 0.34 g/l/hr，但油脂含量較低；提供三盞 LED 光源(光強度 $3849.9 \mu\text{mole/s/m}^2$)搭配連續饋料策略下，使油脂含量能從無饋料時之 49.5% 上升至 58.6%，進而提高整體油脂生產速率達 0.39 g/l/hr。

5.2 未來展望

對於後續之研究，有以下幾點值得發展與探討：

首先，利用基因改殖或突變方式進行菌種改良，找出具備高油脂含量、高油脂生產速率之菌種，接著以發酵策略為將初始氮源濃度提高，且在提供光源下，以提高細胞生長速率與菌數量，當菌數量達到某一程度之後，以陶瓷過濾膜組過濾掉發酵液，再饋入高碳源濃度之培養液(不含氮源)，以促使細胞穩定累積油脂，進而提高整體油脂生產速率，最後可將 *R. glutinis* 與藻類進行共培養，藻類能提供酵母菌生長所需的 O_2 與有機物質，相反地酵母菌也能提供藻類生長所需的 CO_2 與有機物質，進而提高整體油脂生產速率。

參考文獻

- 謝志強. (2007). 生質柴油市場與技術發展概觀. 新興能源專欄.
- 劉宏娟、張建安、墨玉欣、李建、周玉杰、程可可. (2008). 利用微生物油脂制備生物柴油. 化學反應工程與工藝, 03:0263-0265.
- 葉俊良. (2006). 在光反應器中以二階段策略培養微藻生產油脂之研究. 國立成功大學化學工程研究所碩士論文.
- 沈建緯. (2007). 以批次培養探討 *Mucor rouxii* 生產 γ -次亞麻油酸之研究. 國立成功大學化學工程研究所碩士論文.
- 沈鳳堯. (2007). 培養條件對於 *Mucor sp.* 生產多元不飽和脂肪酸之影響. 私立東海大學化學工程研究所碩士論文.
- Aggelis G, Sourdis J. (1997). Prediction of lipid accumulation degradation in oleaginous micro-organisms growing on vegetable oils. *Antonie van Leeuwenhoek*, 72:159-165.
- Anne B., Kay V., Ronja T., Janina P., Daniel V., Nicole F.D., Reinhard F. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome fpha represses sexual development in the red light. *Current Biology*, 15:1833-1838.
- Bong Kyun Kim, Pyoung Kyu Park, Hee Jeong Chae and Eui Yong Kim. (2004). Effect of phenol on β -carotene content in total carotenoids production in cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Korean Journal of Chemical Engineering*,

21:689-692.

Borkovich K.A., Alex LA., Yarden O., Freitag M., Turner GE., Read ND. et al. (2004).

Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68:100-108.

C. Ratledge. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single

Cell Oil production. *Biochimie*, 86:807-815.

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.

Evans CT., Ratledge C. (1984). Influence of nitrogen metabolism on lipid

accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. *Journal of General Microbiology*, 108:249-264.

Feiyan Xue, Jinxin Miao, Xu Zhang, Hui Luo, Tianwei Tan. (2007). Studies on lipid

production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresource Technology*, 99:5923-5927.

Gordana Vunjak-Novakovic, Yoojeong Kim, Xiaoxi Wu, Isaac Berzin, and Jose C. Merchuk.

(2005). Air-Lift Bioreactors for Algal Growth on Flue Gas: Mathematical Modeling and PilotPlant Studies. *Industrial and Engineering Chemistry Research*,

44:6154-6163.

- Guil-Guerrero JL., Navarro-Juarez R., Lopez-Martinez JC., MM.Campra-Madrid P., Reboloso-Fuentes. (2004). Functional properties of the biomass of three microalgal species. *Journal of Food Engineering*, 65:511-517.
- Hua Ye., Yongqiang Zhu., Feiyan Xue., Tianwei Tan. (2010). Two-stage fermentation method for lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnology*, 150S:571-576.
- Hideyuki Sakaki., Tatsuya Nakanishi., Aki Tada., Sadao Komemushi., and Wataru Miki. (2001). Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. *Bioscience and Bioengineering*, 92:294-297.
- Johnson V., Singh M., Saini V.S., Sista V.R. and Yadav N.K. (1992). Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *Microbiology and Biotechnology*, 8:382-384.
- Kavadia A., Komaitis M., Chevalot I., Blanchard F., Mark I., Aggelis G. (2001). Lipid and γ -linolenic acid Accumulation in strain of *Zygomycetes* growing in glucose. *American Oil Chemists' society*, 78(4):341-346.
- Li Yonghong., Zhao Zongbao (Kent), Bai Fengwu. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 41:312-317.
- Meng X. et al. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganism.

Renewable Energy, 34:1-5.

Metzger P, Largeau C. (2005). *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3:1-20.

Miao, Xiaoling, Wu. Qingyu. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, 97:841-6.

Pan JG, Kwak MY, Rhee JS. (1986). High density cell culture of *Rhodotorula glutinis* using oxygen-enriched air. *Biotechnology Letters*, 8:715-718.

Papanikolaou S., Chevalot I, Komaitis M, Marc I, Aggelis G. (2002). Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58:308-312.

Pippan D. (2002). Environmental exaluation of biofuel. *Periodica Polytechnica Series Social and Management Sciences*, 10:95-116.

Ratledge C. (1982). Microbial oil and fats: an assessment of their commercial potential. *Progress in industrial microbiology*, 16:119-206.

Ratledge C. (1994). Yeast, moulds, algae and bacteria as source of lipid, in advances in improved and alternative sources of lipids. *Blackie Publishers, London, England*, 235-291.

Ratledge C., Wynn JP. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid

accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 51:1-44.

Saengea C., Cheirsilp B., Suksaroge T. T., and Bourtoomc 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*, 46:210-218.

Siguo Wu, Cuimin Hu, Guojie Jin, Xin Zhao, Zongbao K. Zhao. (2010). Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, 101:6124-6129.

Choi S. Y., Denwey D. Y. Ryu, Rhee J. S. (1982). Production of microbial lipid: Effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24:1165-1172.

Takeo Seiki, Shkuradani Eiji, Tomi Akiko, Inoara-Ochiai Misa, Kawashima Hiroshi, Shimizu Sakayu. (2005). Transformation of oil-production fungus, *Mortierella alpine 1s-4*, using zeocin, and application to arachidonic acid production. *Bioscience and Bioenergy*, 100(6):617-622.

Ticell J. (2000). From the fryer to the fuel tank. *Tickell Eneretgy Consulting:Tallahassee, FL*.

Vicente G, Bautista LF, Rodriguez R, Gutierrez FJ, et al. (2009). Biodiesel production

from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering*, 48:22-27.

Xin Meng, Jianming Yang, Xin Xu, Lei Zhang, Qingjuan Nie, Mo Xian. (2009).

Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34:1-5.

Xue F, Zhang X, Luo H, Tan T. (2006). A new method for preparing raw material for

biodiesel production. *Process Biochemistry*, 41:1699-1702.

Zhang Ping, Yuan Mingzhe, Wang Hong. (2007). Study on dissolved oxygen control

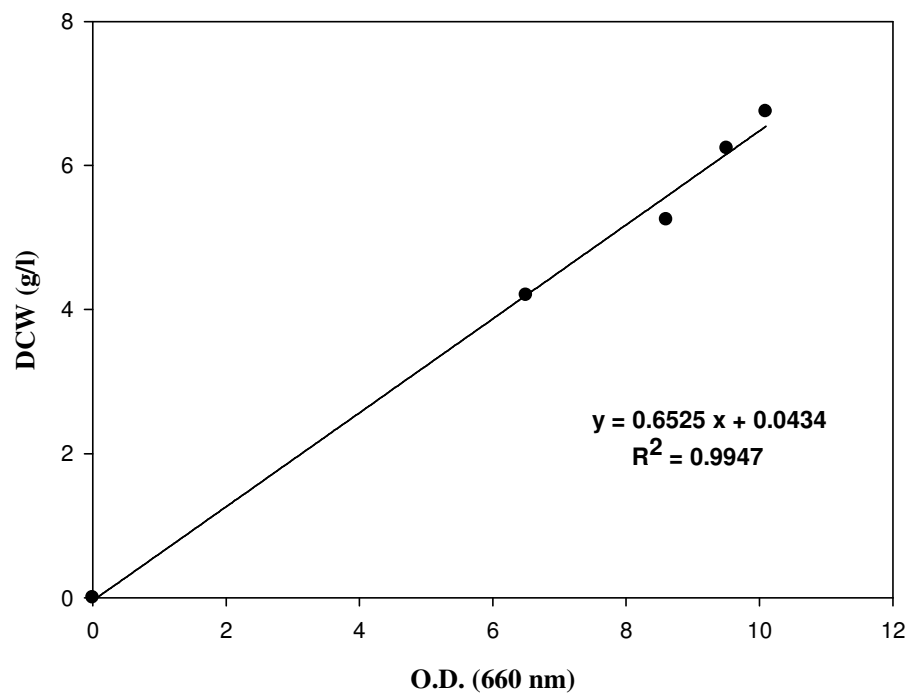
method based on international evaluation benchmark. *Information and control*,

36(2):199-203.

附錄

附錄 A

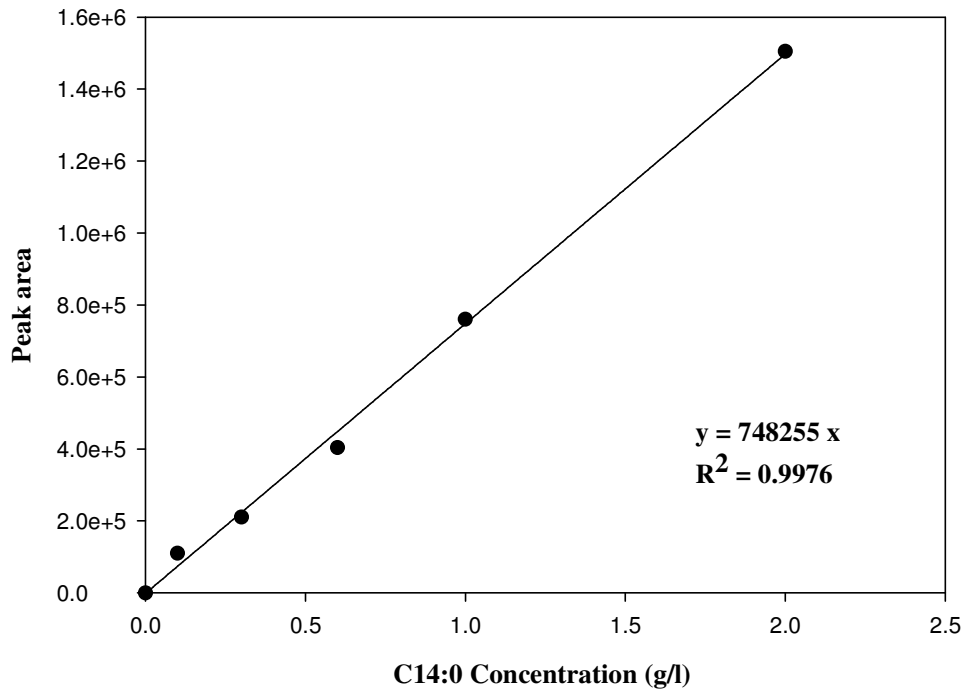
菌體乾重 (biomass) 檢量線



Biomass 檢量線方程式： $DCW(g/l)=0.6525 \times O.D._{660\text{ nm}}+0.0434$

附錄 B.1

Methyl tetradecanoate (C14:0) 標準檢量線

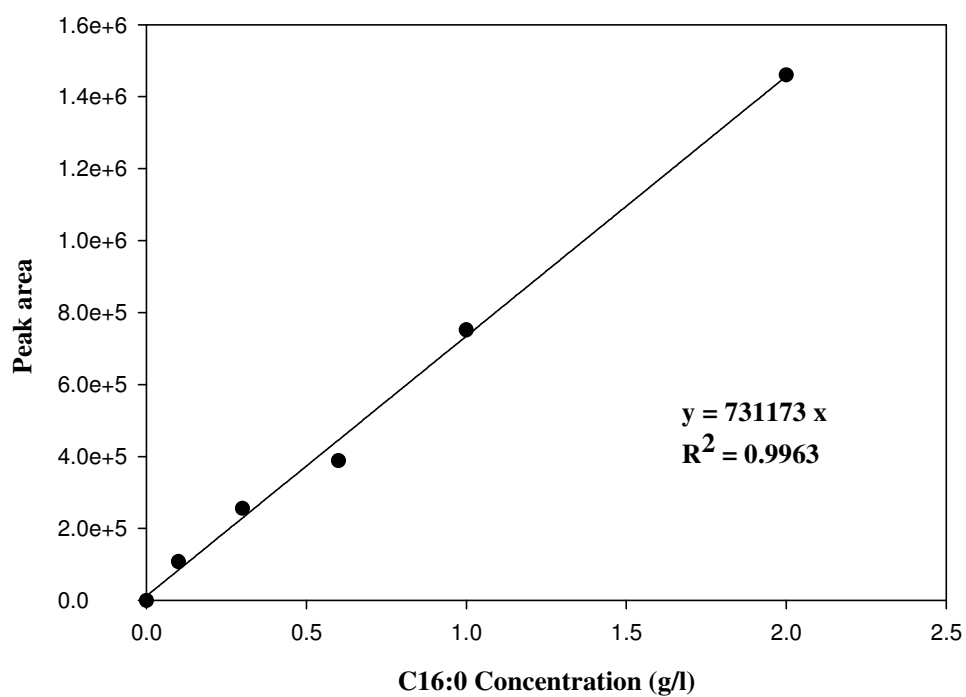


Methyl tetradecanoate (C14:0) 標準檢量線方程式：

$$\text{Peak area} = 748255 \times (\text{C14:0 Concentration})$$

附錄 B.2

Methyl palmitate (C16:0) 標準檢量線

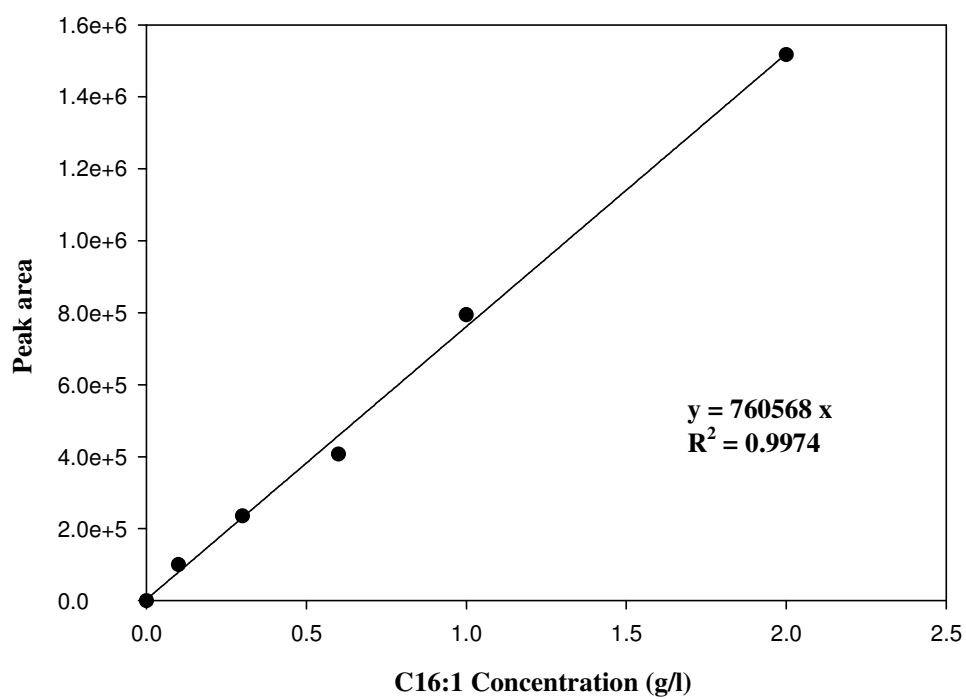


Methyl palmitate (C16:0) 標準檢量線方程式：

$$\text{Peak area} = 731173 \times (\text{C16:0 Concentration})$$

附錄 B.3

Palmitoleic acid methyl ester (C16:1) 標準檢量線

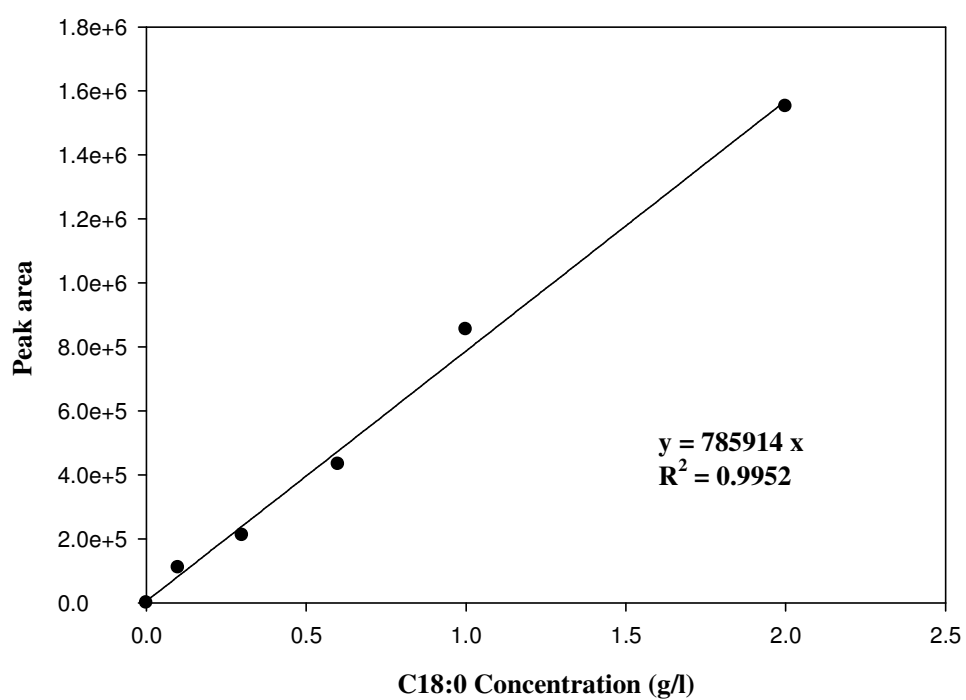


Palmitoleic acid methyl ester (C16:1) 標準檢量線方程式：

$$\text{Peak area} = 760568 \times (\text{C16:1 Concentration})$$

附錄 B.4

Methyl stearate (C18:0) 標準檢量線

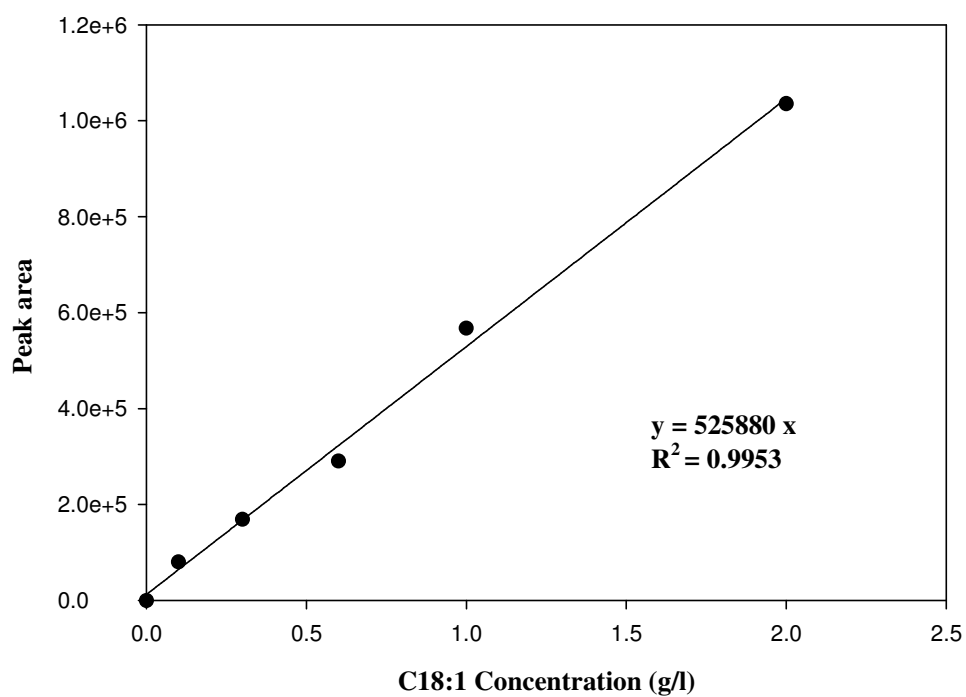


Methyl stearate (C18:0) 標準檢量線方程式：

$$\text{Peak area} = 785914 \times (\text{C18:0 Concentration})$$

附錄 B.5

Methyl oleate (C18:1) 標準檢量線

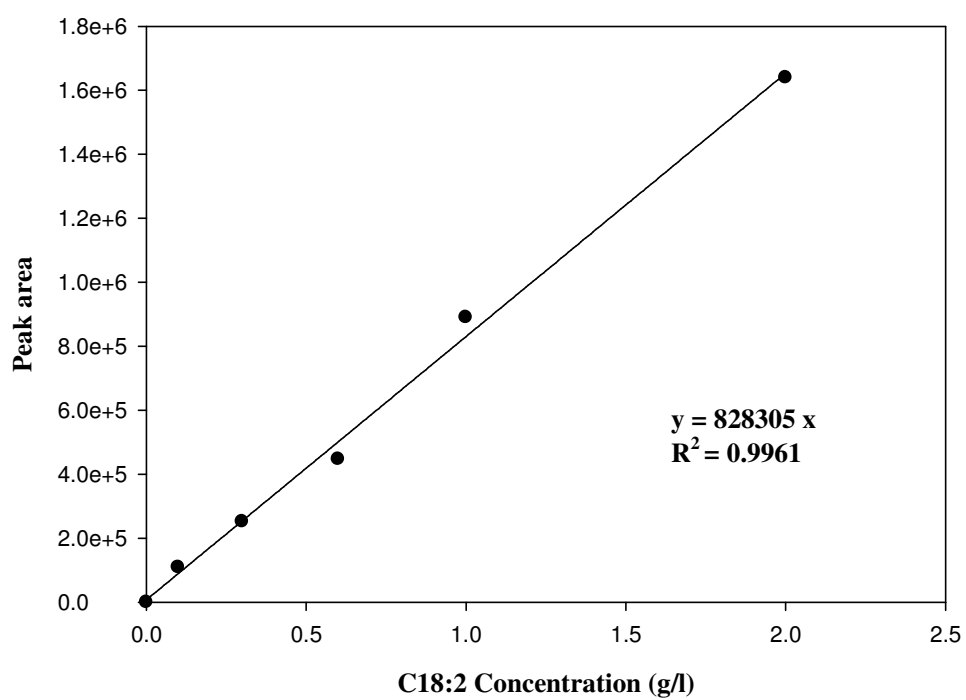


Methyl oleate (C18:1) 標準檢量線方程式:

$$\text{Peak area} = 525880 \times (\text{C18:1 Concentration})$$

附錄 B.6

Linoleic acid methyl ester (C18:2) 標準檢量線

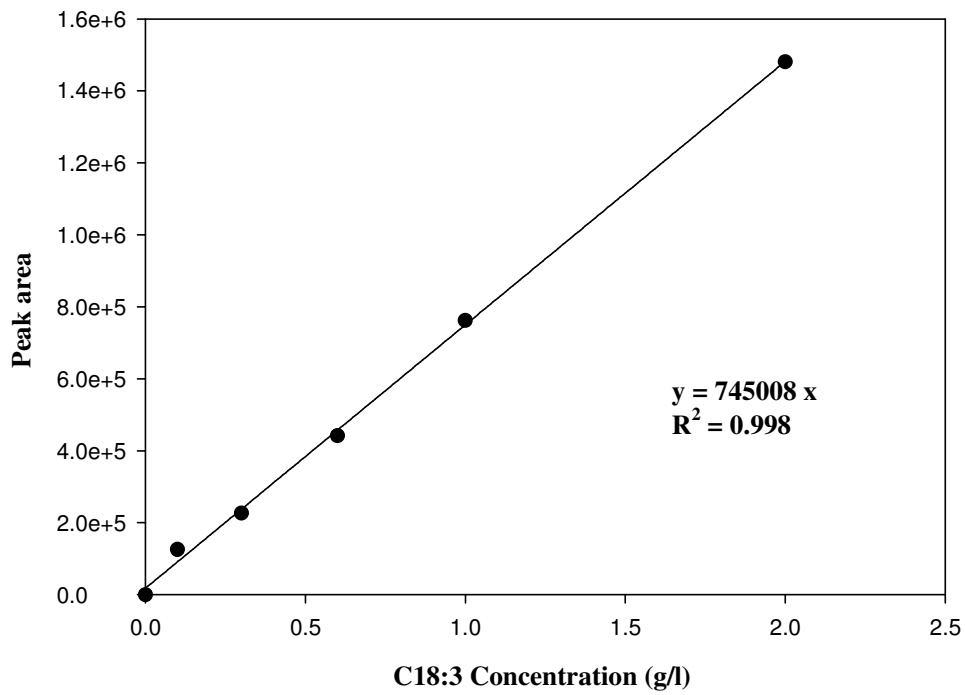


Linoleic acid methyl ester (C18:2) 標準檢量線方程式：

Peak area=828305×(C18:2 Concentration)

附錄 B.7

Linolenic acid methyl ester (C18:3) 標準檢量線



Linolenic acid methyl ester (C18:3) 標準檢量線方程式: