

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.

探討共培養黏紅酵母菌與柵藻對菌體生長與油脂累積之

影響

The effects of coculture of *Rhodotorula glutinis* and  
*Scenedesmus obliquus* on cells growth and total lipids  
accumulation

研究生：陳儷娟 撰

Graduate student : Lijuan Chen

中華民國 102 年 1 月

Jan, 2013

## 摘要

黏紅酵母菌(*Rhodotorula glutinis*)在發酵過程中會代謝碳源釋出 CO<sub>2</sub>，產生抑制生長的有機酸，造成 pH 值下降。柵藻(*Scenedesmus obliquus*)進行光合作用代謝 CO<sub>2</sub>，釋出 O<sub>2</sub>；光源的照射皆能促進黏紅酵母菌與柵藻的生長。本研究藉由共培養(Coculture)黏紅酵母菌與柵藻移除抑制生長的代謝產物，以提供一個適合黏紅酵母菌與柵藻生長的環境，藉此促進生物質量的增加與油脂的累積，作為生質柴油的原料。

在相同培養條件下，單獨培養(Pure culture)黏紅酵母菌得到生物質量  $11.1 \pm 0.44$  g/L，油脂累積量  $1.777 \pm 0.278$  g/L；柵藻得到生物質量  $2.0 \pm 0.06$  g/L，油脂累積量  $0.370 \pm 0.015$  g/L；共培養則得到生物質量  $14.05 \pm 0.07$  g/L，油脂累積量  $3.594 \pm 0.251$  g/L，顯示出共培養對菌體生長與油脂累積有較佳的效果。黏紅酵母菌的脂肪酸之 C16:0 與 C18:1 的含量總合為 84.68%，柵藻為 83.14%，共培養則為 90.99%。

培養基的組成與外在的培養條件會影響微生物的生長與油脂的累積，故藉搖平實驗探討接菌比例、氮源濃度、葡萄糖濃度、鹽度(NaCl)、起始 pH、檔板之影響、溫度與光照及強度的影響，並於 5 L 發酵槽與 6 L 氣舉式生物反應器進行放大培養，了解共培養放大規模的可能性。

接菌比例實驗中顯示接菌比例對於共培養影響並不顯著。從氮源濃度實驗中得知，柵藻對無機氮源(KNO<sub>3</sub>)的選擇性較高，KNO<sub>3</sub>濃度的增加會促進柵藻的生長；而黏紅酵母菌對有機氮源(Yeast extract, YE)的選擇性較高，YE的添加促進酵母菌的生長效果高於柵藻，有較高的生物質量與油脂累積量。碳源濃度的增加使培養基形成碳源充足、氮源限制的培養條件，促進油脂的累積；當葡萄糖濃為50 g/L時，生物質量達  $15.1 \pm 1.04$  g/L，油脂累積量達  $5.952 \pm 0.392$  g/L，油脂含量為  $39.34 \pm 1.05$  g/L。鹽度的添加會促進油脂的累積並使葉黃素產量略微增加，油脂累積量提升了 13.4%。0.5 g/L NaCl 延遲添加可促進β胡蘿蔔素的生成，產率提高了 435~490%。

在 pH 值實驗中顯示 pH 值的提高會抑制柵藻的生長。通氣量的增加會促進酵母菌的生長，但會造成光遮蔽效應，使微藻光合作用的進行受到抑制。培養溫度 24°C 對共培養而言是比較理想的溫度選擇，不利的培養環境對菌體的生長造成壓力，使得生物質量下降，油脂累積量提高，約為 33~37%。光源的添加，*S. obliquus* 會進行光合作用，釋出氧氣供 *R. glutinis* 生長使用，促進彼此間的生長。

光強度的增加，促進 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 的生長；生長較快速的 *R. glutinis* 對 *S. obliquus* 形成光遮蔽效應。光強度的增加會促進 *R. glutinis* 的生長，卻不利於油脂的累積。5 L 發酵槽實驗中，2% CO<sub>2</sub> 的添加可以提高共培養的效果。6 L 氣舉式發酵反應器實驗中，培養基含 1.25 g/L KNO<sub>3</sub> 與 2 g/L YE 條件下，共培養

所得的生物質量為 7.1 g/L；含 0.5 g/L  $\text{KNO}_3$  且無 YE 條件下，共培養所得的生

物質量為 6.1 g/L，顯示光遮蔽效應的影響大於培養基中碳氮源的濃度。

**關鍵字：**黏紅酵母菌、柵藻、共培養、脂質

## Abstract

During cultivation, *Rhodotorula glutinis* utilized C source and released CO<sub>2</sub>. Moreover, organic acids were synthesized and the pH of culture dropped. As a result, the growth of yeast was inhibited. *Scenedesmus obliquus* utilized CO<sub>2</sub> and released O<sub>2</sub> during photosynthesis. The cells growth of *R. glutinis* and *S. obliquus* would be raised with light exposed. The metabolites are inhibitive to *R. glutinis* and *S. obliquus* in the medium were removed and it was suitable to grow for yeast and algae. The accumulations of biomass and total lipids in the coculture are suitable for biodiesel production.

The biomass concentration of  $11.1 \pm 0.44$  g/L and the total lipids accumulation of  $1.777 \pm 0.278$  g/L were obtained by *R. glutinis* in the pure culture. The biomass concentration of  $2.0 \pm 0.06$  g/L and the total lipids accumulation of  $0.370 \pm 0.015$  g/L were obtained by *S. obliquus* in the pure culture. The biomass concentration of  $14.05 \pm 0.07$  g/L and the total lipids accumulation of  $3.594 \pm 0.251$  g/L were obtained in the coculture. It was shown the results of the coculture are better than the pure culture's. The total percentages of palmitic (C16 : 0) and oleic acids (C18 : 1) are raised to 90.99 % of the coculture from the 84.68 % of *R. glutinis* and 83.14 % of *S. obliquus* in the pure culture.

The cells growth and total lipids accumulation are effected by the composition of the medium and the environment. The ratio of inoculation of yeast and algae, the concentration of N source, the concentration of glucose, NaCl, initial pH, the baffle, the temperature and the intensity of light were studied in flasks. The possipility of scale-up was studied in the 5 L fermentor and 6 L air-lift bioreactor.

The effect of the ratio was unobvious based on the experiment of the ratio of inoculation. Based on N source experiment, the algae prefered inorganic N source ( $\text{KNO}_3$ ) and the cells growth were raised with concentration of  $\text{KNO}_3$  increasing. Ferthermore, the yeast prefered organic N source (Yeast extract, YE). Compared with algae, the cells growth of yeast was progressed better. The higher biomass and total lipids accumulation were obtained from yeast. Under N-limited, the total lipids accumulation is promoted with glucose concentration increased. The biomass of  $15.1 \pm 1.04$  g/L, the total lipids accumulation of  $5.952 \pm 0.392$  g/L and the total lipid content of  $39.34 \pm 1.05$  % are obtained at 50 g/L glucose. The total lipids accumulation and the yield of lutein were advanced with NaCl adding. The total lipids accumulation was increased 13.4 %. The yield of  $\beta$ -carotene was increased 435 ~ 490 % with the addition of 0.5 g/L NaCl delayed.

The growth of algae was inhibited at high pH based on the pH experiment. The growth of yeast was advanced when the aeration was increased. However, owing to

the high concentration of yeast cells the light may have hardly penetrated and its intensity attenuated drastically. As a result, the photosynthesis of algae was inhibited. The temperature 24 °C is suitable for the coculture of yeast and algae. The cells growth was stressed under an unsuitable cultivation. The biomass was decreased and the total lipids accumulation was increased about 33~37 %. Based on the light experiment, *R. glutinis* was promoted when *S. obliquus* photosynthesized and released O<sub>2</sub> with the light. The growth of *S. obliquus* and *R. glutinis* were advanced except for the lipids accumulation with the light intensity raised. The higher growth rate of *R. glutinis* resulted in the shading effect to *S. obliquus*. Based on 5 L fermentor experiment, the effect of the coculture was advanced with 2 % CO<sub>2</sub> added. Based on the 6 L air-lift bioreactor experiment, the biomass of 7.1 g/L was obtained at a coculture with 1.25 g/L KNO<sub>3</sub> and 2 g/L YE added. However, the biomass of 6.1 g/L was obtained at a coculture with 0.5 g/L KNO<sub>3</sub> added and without YE. It was shown that the shading effect is earthshaking compared to the nutrient in the medium.

**Keywords :** *Rhodotorula glutinis*, *Scenedesmus obliquus*, lipids

## 謝誌

研究所的求學階段終於告一段落，心中滿滿地興奮與感動。求學的過程雖然並非一帆風順，當中也有挫折與不安，但是因為身邊有一群重要的人，所以我可以跨越層層困難，直到今日順利完成碩士學位。

首先，我要非常感謝我的指導教授 顏宏偉，這些年的教導與啟發，幫助我學會獨立思考與解決問題的能力，並且對我有及大的包容與信心。求學期間，老師給了我很多的鼓勵與幫助，並讓我機會接觸不同的事物，讓我在求學階段有不一樣的經驗與學習。同時也非常感謝楊芳鏘教授、劉永銓教授對本論文的指導與建議，幫助學生的視野可以更加寬廣，透過不同角度的思考，使本論文可以更臻完善，在此獻上誠摯的感謝。

在研究所的求學過程中，謝謝實驗室學長姐德威、嘉麟、宜珈、于萱、怡汶、大雄、阿甫、智勇、緯哥、方瑋、阿姨、冰冰、鴨子、欣培、金門、Laco、嘉豪、芒果、凱平等學長姐的幫助與指導；謝謝同學金杉、義成、小培、小紀、阿凱、小光及學弟妹西瓜、毛毛、旻玉、容慈、詠琳、喇叭等的協助與支持。謝謝身邊的老師與朋友們，因為有你們的陪伴與鼓勵，使研究所的生活更加豐富愉快。最後，謹將此論文獻給我最愛的父母與家人們，因為你們的付出與陪伴，給我莫大的鼓勵與支持，使我可以勝過一切的挑戰與挫折，並再次謝謝身邊每一個曾經幫助我的人，謝謝你們！



# 目錄

摘要 .....	I
Abstract .....	IV
圖目錄 .....	XII
表目錄 .....	XIV
第一章 緒論 .....	1
第二章 文獻回顧 .....	3
2.1. 微藻 .....	3
2.1.1. 微藻簡介 .....	3
2.1.2. 影響微藻生長之環境因子 .....	7
2.1.3. 微藻培養方式 .....	12
2.1.4. 柵藻( <i>Scenedesmus</i> ) .....	12
2.2. 酵母菌 .....	13
2.3. 生物燃料(Biofuel) .....	14
2.4. 微生物油脂介紹 .....	17
2.5. 影響油脂累積之環境因子 .....	17
2.5.2. 培養時間 .....	17
2.5.3. 溫度 .....	17
2.5.4. pH 值 .....	18
2.5.5. 溶氧量 .....	18
2.5.6. 光 .....	18
2.5.7. 碳源與氮源 .....	19
2.6. 類胡蘿蔔素(Carotenoids) .....	19
2.6.2. 葉黃素(Lutein) .....	20
2.6.3. $\beta$ -胡蘿蔔素( $\beta$ -carotene) .....	22
第三章 實驗材料與方法 .....	23
3.1. 實驗材料 .....	23

3.1.1.	藻種 .....	23
3.1.2.	菌株 .....	24
3.1.3.	實驗藥品 .....	25
3.2.	實驗儀器.....	27
3.3.	分析方法.....	29
3.3.1.	光照強度測定方法 .....	29
3.3.2.	藻體濃度分析方法 .....	29
3.3.3.	菌體濃度分析方法 .....	29
3.3.4.	利用紅外線水分分析儀測量樣品濃度.....	29
3.3.5.	菌數分析方法 .....	30
3.3.6.	葡萄糖濃度分析方法 .....	31
3.3.7.	總脂質濃度分析方法 .....	31
3.3.8.	脂質成分分析方法 .....	31
3.3.9.	葉黃素(Lutein)濃度測量方法(Tukaj et al., 2003) .....	34
3.3.10.	類胡蘿蔔素( $\beta$ -carotene)分析方法.....	35
3.4.1.	藻種保存 .....	36
3.4.2.	藻種活化 .....	36
3.4.3.	菌種保存 .....	36
3.4.4.	接菌 .....	36
3.4.5.	培養基組成 .....	37
3.5.	實驗架構.....	38
3.6.	實驗培養條件.....	39
3.6.1.	搖瓶批次發酵程序 (Flask experiment) .....	39
3.6.1.1.	共培養(Coculture)對個別生長(Pure culture)之影響.....	39
3.6.1.2.	不同接菌比例之影響 .....	39
3.6.1.3.	氮源濃度之影響 .....	40
3.6.1.4.	碳源濃度之影響 .....	41

3.6.1.5. 鹽度(NaCl)添加之影響 .....	42
3.6.1.6. 起始 pH 值之影響 .....	43
3.6.1.7. 檔板之影響 .....	43
3.6.1.8. 溫度之影響 .....	43
3.6.1.9. 光照之影響 .....	44
3.6.1.10. 光強度之影響 .....	44
3.6.2. 攪拌式發酵槽批次程序 .....	45
3.6.3. 6 L 氣舉式發酵反應器 (Air-lift bioreactor).....	46
3.7. 實驗裝置圖.....	47
3.7.1. 500 ml 反應器設備圖 .....	47
3.7.1 共培養之搖瓶實驗裝置圖.....	48
3.7.2 5L 發酵槽與 6L 氣舉式發酵槽裝置圖 .....	50
第四章 實驗結果與討論 .....	51
4.1. 搖瓶批次發酵程序 (Flask experiment) .....	51
4.1.1. 共培養(Coculture)對個別生長(Pure culture)之影響.....	51
4.1.2. 不同接菌比例之影響 .....	55
4.1.3. 氮源濃度之影響 .....	56
4.1.4. 碳源濃度之影響 .....	62
4.1.5. 鹽度(NaCl)添加之影響.....	64
4.1.6. 起始 pH 值之影響 .....	69
4.1.7. 檔板之影響 .....	71
4.1.8. 溫度之影響 .....	73
4.1.9. 光照之影響 .....	74
4.1.10. 光強度之影響 .....	75
4.2. 攪拌式發酵槽批次程序.....	77
4.3. 6 L 氣舉式發酵反應器 (Air-lift bioreactor).....	79
4.4. 發酵策略之比較.....	80

第五章 結論與未來展望.....	83
5.1. 結論.....	83
5.2. 未來展望.....	86
參考文獻.....	87
附錄.....	94

## 圖目錄

圖 2-1	微藻分類(web1.nsc.gov.tw) .....	3
圖 2-2	光合作用效率與光照強度之關係圖(Masojidek et al., 2004) .....	8
圖 2-3	溶解無機碳比例與酸鹼值關係圖(孫, 2011) .....	11
圖 2-4	葉黃素結構(孫, 2011) .....	21
圖 2-5	$\beta$ -胡蘿蔔素結構( <a href="http://zh.wikipedia.org/zh-tw">http://zh.wikipedia.org/zh-tw</a> ) .....	22
圖 3-1	<i>S. obliquus</i> 於顯微鏡下的外觀(200x) .....	23
圖 3-2	<i>R. glutinis</i> 於顯微鏡下的外觀(200x) .....	24
圖 3-3	<i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之顯微鏡圖 (200x) .....	30
圖 3-4	脂肪酸分析之樣品前處理流程圖(張, 2011) .....	33
圖 3-5	葉黃素分析步驟(孫, 2011) .....	34
圖 3-6	實驗架構圖 .....	38
圖 3-7	500 ml 反應器設備圖(孫,2011) .....	47
圖 3-8	共培養之搖瓶實驗裝置圖 .....	48
圖 3-9	單獨培養 <i>R. glutinis</i> 96 小時之變化情形 .....	49
圖 3-10	單獨培養 <i>S. obliquus</i> 96 小時之變化情形 .....	49
圖 3-11	共培養 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 小時之變化情形 .....	49
圖 3-12	5L 發酵槽與 6L 氣舉式發酵槽之裝置圖 .....	50
圖 4-1	共培養對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 之生長之影響 .....	52
圖 4-3	共培養對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 之葉黃素與 $\beta$ -胡蘿蔔素累積的影響 .....	54
圖 4-4	不同接菌比例對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之生長之影響 .....	56
圖 4-5	不同接菌比例對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之油脂累積的影響 .....	56
圖 4-6	不同起始 $\text{KNO}_3$ 濃度對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之生長之影響 .....	57
圖 4-8	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的添加對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之生長之影響 .....	59
圖 4-9	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的添加對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之油脂累積的影響 .....	60

圖 4-10	YE 的添加對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之生長之影響.....	61
圖 4-11	YE 的添加對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之油脂累積的影響.....	62
圖 4-12	不同起始葡萄糖濃度對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之生長之影響 .....	63
圖 4-13	不同起始葡萄糖濃度對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養油脂累積之影響 .....	64
圖 4-14	不同起始鹽度對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之生長之影響 .....	65
圖 4-15	不同起始鹽度對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之油脂累積的影響 .....	66
圖 4-16	不同起始鹽度對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 葉黃素與 $\beta$ -胡蘿蔔素累積的影響..	66
圖 4-17	0.5 g/L NaCl 添加時間對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養生長之影響.....	68
圖 4-18	0.5 g/L NaCl 添加時間對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養油脂累積之影響....	68
圖 4-19	0.5 g/L NaCl 添加時間對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之葉黃素與 $\beta$ -胡蘿蔔素累積的影響 .....	69
圖 4-20	不同起始 pH 對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之生長之影響.....	70
圖 4-21	不同起始 pH 對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之油脂累積的影響 .....	71
圖 4-22	檔板(Baffle)對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之生長之影響 .....	72
圖 4-23	檔板(Baffle)對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之油脂累積的影響 .....	72
圖 4-24	不同培養溫度對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之生長之影響 .....	73
圖 4-25	不同培養溫度對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之油脂累積的影響 .....	74
圖 4-26	光照對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之影響 .....	75
圖 4-27	不同光強度對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之生長之影響 .....	76
圖 4-28	不同光強度對 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之油脂累積的影響 .....	77
圖 4-29	<i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 於 5L 發酵槽中單獨培養(Pure culture)與共培養 (Coculture)的生物質量與葡萄糖之變化 .....	78
圖 4-30	<i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 於 5L 發酵槽中單獨培養(Pure culture)與共培養 (Coculture)的油脂累積與油脂含量 .....	79
圖 4-31	6L 氣舉式發酵反應器， <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 於不同培養條件下的生物質量與葡萄糖之變化 .....	80

## 表目錄

表 3-1	實驗藥品清單.....	25
表 3-1	實驗儀器清單.....	27
表 3-3	Basal 培養基(Shi et al., 1997).....	37
表 3-4	種子培養基 (Seed Medium , SM).....	38
表 3-5	共培養培養基(Coculture Medium , CCM).....	38
表 4-1	<i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 於單獨培養與共培養下之菌數值 .....	52
表 4-2	<i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 於單獨培養與共培養下之脂肪酸組成 .....	54
表 4-3	<i>S. obliquus</i> 與 <i>R. glutinis</i> 於不同接菌比例下之菌數值 .....	55
表 4-4	<i>S. obliquus</i> 與 <i>R. glutinis</i> 於不同起始 $\text{KNO}_3$ 濃度之菌數值 .....	57
表 4-5	添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 下之 <i>S. obliquus</i> 與 <i>R. glutinis</i> 的菌數值 .....	59
表 4-6	YE(Yeast extract)添加與否對 <i>S. obliquus</i> 與 <i>R. glutinis</i> 共培養菌數之影響....	61
表 4-7	<i>S. obliquus</i> 與 <i>R. glutinis</i> 於不同起始葡萄糖濃度之菌數值 .....	63
表 4-8	<i>S. obliquus</i> 與 <i>R. glutinis</i> 於不同起始 NaCl 濃度之菌數值 .....	65
表 4-9	0.05 g/L NaCl 添加時間對 <i>S. obliquus</i> 與 <i>R. glutinis</i> 共培養菌數之影響.....	67
表 4-10	<i>S. obliquus</i> 與 <i>R. glutinis</i> 於不同起始 pH 之菌數值.....	70
表 4-11	檔板(Baffle)對 <i>S. obliquus</i> 與 <i>R. glutinis</i> 菌數值之影響 .....	71
表 4-12	不同培養溫度對 <i>S. obliquus</i> 與 <i>R. glutinis</i> 共培養的菌數值之影響 .....	73
表 4-13	不同培養光強度對 <i>S. obliquus</i> 與 <i>R. glutinis</i> 共培養的菌數值之影響 .....	76
表 4-14	<i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 共培養之搖瓶與 5L 發酵槽之比較.....	78
表 4-15	共培養文獻與本實驗研究結果之比較.....	82
表 4-16	各實驗參數之 <i>R. glutinis</i> 與 <i>S. obliquus</i> 菌數之比較 .....	104
表 4-17	各實驗參數的生物質量、油脂累積、油脂含量與產率之比較.....	106
表 4-18	<i>R. glutinis</i> 之發酵培養基(Fermentor medium , FM) .....	108

## 第一章 緒論

自工業革命以來，為因應工業的發展，煤炭、石油、天然氣等石化燃料的使用與需求逐年增加，毫無節制地使用石化燃料造成能源匱乏的危機，且大量二氧化碳與汙染物質的排放，使地球環境快速的改變，導致溫室效應、全球暖化、海平面上升、氣候異常等現象。因此，開發乾淨、無汙染且可再生之能源儼然已成為全球關注的議題之一。

全球石化燃料日益短缺，石化能源價格持續飆漲。在各種替代能源中，生質能源的開發與利用近年來受到重視。生質能源主要是藉綠色作物吸收陽光獲得能量以進行光合作用，將大氣中的二氧化碳固定成碳水化合物，碳水化合物再轉化成生質能源。生質能源具有永續、再生且無二氧化碳淨排放量等優點。但過高的原料成本及與民爭食等問題，限制了生質能源的發展。

利用細菌、酵母菌、黴菌與微藻等富含油脂的微生物作為生產生質能源的原料，其所生產的油脂組成類似植物油，且高生長速率與低價的原料成本使生質能源的發展更具潛力與可能性。

為了開發具有商業價值的生質能源，利用酵母菌與微藻培養過程中所產生的代謝物質之互補性進行共培養的研究。酵母菌在培養的過程中，會消耗碳源產生有機酸與  $\text{CO}_2$ ，抑制酵母菌的生長，並造成培養基 pH 值的下降；微藻在進行光合作用的過程中，代謝  $\text{CO}_2$  會釋出  $\text{OH}^-$ ，造成培養基 pH 值的上升，並產生  $\text{O}_2$ 。文獻中指出，共培養條件下，微藻可以作為  $\text{O}_2$  的供應者，而酵母菌作為  $\text{CO}_2$  的



提供者(Xue et al., 2010);且微藻能夠使用酵母菌產生的有機酸,如丙酮酸(Pyruvic acid)、醋酸(Acetic acid),而照光的環境亦可以促進酵母菌的生長(張, 2011)。微藻與酵母菌所生成的營養成分,如葉黃素(Lutein)、 $\beta$ -胡蘿蔔素( $\beta$ -carotene),可作為高價的副產品,降低生產生質能源的成本。故本實驗進行共培養黏紅酵母菌(*Rhodotorula glutinis*)與柵藻(*Scenedesmus obliquus*)之研究,藉外在環境與培養基成分的改變來探討菌體生長與油脂累積之影響,並藉 5 L 發酵槽(Fermenter)與 6 L 氣舉式反應器(Air-lift bioreactor)進行放大培養。

## 第二章 文獻回顧

### 2.1. 微藻

#### 2.1.1. 微藻簡介

藻類是屬於真核微生物的一種，藉吸收二氧化碳與光，轉換釋放出氧氣，供給大氣中重要元素。根據化石遺跡推斷，距今三十五億年前即出現在地球上，它的種類繁多，分佈廣泛，可以在海洋、河川甚至陸地都可以發現藻類的身影。大部分的微藻以單細胞形式存在，在顯微鏡下才能辨別型態，細胞大小藉於數微米到幾十微米不等(鄭, 2007；孫, 2011；劉, 2011)。

依據色素組成、細胞壁有無及組成、細胞核種類、儲存物種類、鞭毛等可以將微藻分為九類，藍綠藻門(Cyanophyta)、綠藻門(Chlorophyta)、輪藻門(Charophyta)、裸藻門(Euglenophyta)、金黃藻門(Chrysophyta)、甲藻門(Pyrrhophyta)、隱藻門(Cryptophyta)、褐藻門(Phaeophyta)、紅藻門(Rhodophyta)，如圖2-1 (闕, 2009)。

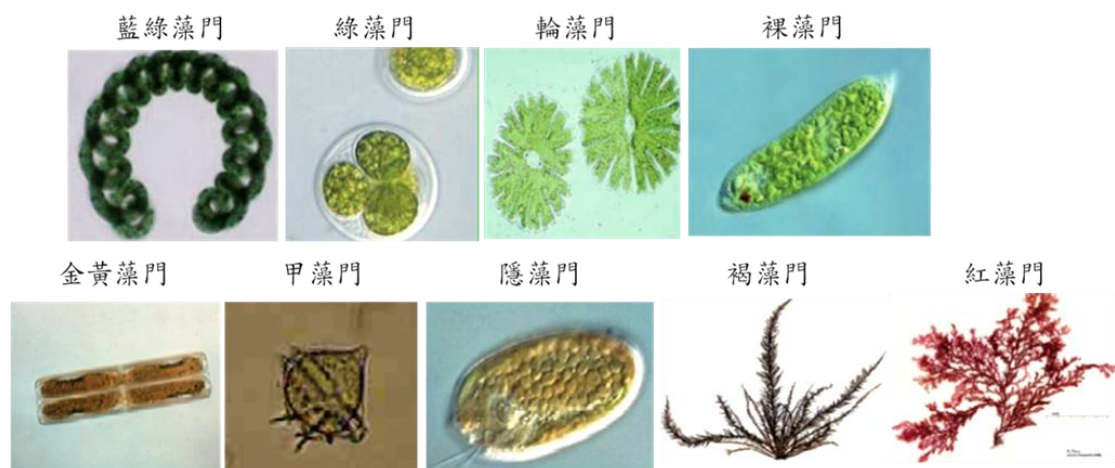


圖 2-1 微藻分類(web1.nsc.gov.tw)

人類最早的藻類應用是以食物來源為主，微藻的食用紀錄可追溯到 2000 年前，中國使用念珠藻度過饑荒。18 世紀開始，藻類的應用逐漸多元廣泛，包括食品、飼料、添加劑、化妝品與色素等。以藻類生技為主的產業，每年約產出千萬噸的藻類作為各種商業化應用，依藻類生技的應用現況分類如下(劉, 2011)：

### (1) 人用保健食品

微藻有高含量的蛋白質(28~71%)、維生素、脂溶性化合物、纖維素、脂質等營養素，被廣泛開發為保健食品，機能訴求包括抗氧化、提升免疫力、調整腸胃道功能和參與脂質代謝等，其中以綠藻(*Chlorella*)和螺旋藻(*Spirulina*)類的保健產品為大宗。此外，藻類中某些成分更被用於癌症藥物開發研究，根據美國 Algrosolutions 資料顯示，人用保健藻類的消費市場約有 770 億美元。

人類、動物與較高等的植物缺乏合成長鏈  $\omega 3$  多元不飽和脂肪酸的酵素可從微藻中獲得。寇氏隱甲藻(*Cryptocodinium coh-nii*)生產的二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA)現以商品化。歐洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)亦發表 DHA 的健康聲明，食用 DHA 和穩定血中的三酸甘油酯正常濃度有相關性，並對腦部功能和視力保護有其助益。

### (2) 動物飼料

許多研究結果顯示，以藻類作為飼料添加劑可以增加傳統飼料的營養成分，對動物的生理機能有所幫助。其中以螺旋藻為主，而綠藻也廣泛用於貓、狗、觀賞魚、家禽、母牛、種公牛等動物飼料中。

### (3) 水產養殖

微藻除了由人類直接消費外，大約 30 % 的產能是消耗在水產品與畜牧用途上。微藻於水產養殖中被當作餌飼(Live feeds)，可直接作為幼苗或雙殼貝類的食物來源，或用來培養動物性餌料生物，再間接由水產幼苗食用，以提高幼苗的存活率，以大量產業化培養的小球藻、螺旋藻為主。

### (4) 化學品與藥品

目前藻類在化學品的發展主要是應用其脂肪酸、色素、維他命及其他生物活性化合物，如三角褐指藻用於食品添加劑。大型藻類中，自石花菜、龍鬚菜等藻類細胞壁萃取的無分支多醣，可作為瓊脂膠體(Hydrocolloid agar)材料，作為微生物學、分子生物學、醫學實驗室常用的標準培養基(Agar)。藻酸鈣(Calcium alginate)被使用在多種醫療產品上以促進傷口癒合，並減輕敷料移除時的疼痛感；由於藻酸鈣具有生物相容性，因此能應用於細胞的固定與包埋。

### (5) 色素

藻類不只含有葉綠素(Chlorophylls)，亦含有類胡蘿蔔素(Carotenoids)與藻膽蛋白(Phycobiliproteins)。類胡蘿蔔素為一脂溶性色素，能使鮭魚保持新鮮的顏色，增加其商業價值。類胡蘿蔔素亦是維他命 A 的前驅物，可作為生物的抗氧化劑，保護細胞與組織免於自由基的傷害，以杜氏鹽藻(*Dunaliella salina*)為 $\beta$ -胡蘿蔔素與其他種類胡蘿蔔素的主要生產藻類。

藻膽蛋白是蛋白質與藻膽色素以共價鍵鍵結而成，為色彩鮮豔且具有螢光的

水溶性色素，可作為食品添加色素，亦可作為生化實驗研究的螢光標記物質。

## (6) 矽藻土

矽藻土(Diatomite)為商業化重要的矽藻衍生物，屬於沉積岩，由石化的外殼與系藻的細胞壁組成。矽藻土應用廣泛，包刮過濾、吸收劑(油、水、化學品)、水泥與混凝土添加劑、顏料與塑膠之填充劑、園藝的培養土與土壤調節劑、輕質建材、貓砂、耐火材料與炸藥等。因其應用多元，矽藻土產量從 1900 年的 3280 噸增加至 2005 年的 200 萬噸。

## (7) 汙染防治

隨著工業的快速發展，人類大量燃燒煤、石油、天然氣等石化燃料，產生大量有害的氣體，如二氧化碳、硫化物(SO<sub>x</sub>)、氮化物(NO<sub>x</sub>)等，而人口膨脹、森林砍伐，導致空氣品質日益惡化。近 100 年來，大氣中的二氧化碳濃度已上升了約 30%，導致地球平均溫度上升 0.6 °C，溫室效應、海平面上升與氣候變遷等現象隨之而來。為降低溫室氣體排放量，利用培養微藻的方式將二氧化碳轉化成碳氫化合物，並同時產生大量的生物質量(Biomass)以作為飼料、肥料、燃料的使用。根據台電公司綜合研究所的實驗結果推估，扣除能耗影響，培養面積為 1 公頃的微藻每年可以固定約 74 噸的 CO<sub>2</sub>，約為植樹 1 公頃每年能吸收 25 噸 CO<sub>2</sub> 的 3 倍，顯示微藻的二氧化碳減量能力不容小覷(闕, 2009；沈, 2010)。

藻類可用於廢水處理，降低汙水與農業廢水中的氮、磷含量，並可移除工業廢水中的有毒重金屬。這類型的藻類必須對培養條件有很大的容忍度，如高鹽度

的培養環境，如大型海藻中的海帶、馬尾藻、昆布和石蓴被證實可吸附銅、鎳、鉛、鋅、鎘等重金屬。

### 2.1.2. 影響微藻生長之環境因子

外在的培養環境會影響微藻的生長速率、菌體生長、油脂累積與含量、脂肪酸組成等，主要的影響因子包含光、二氧化碳濃度、溫度、鹽度、pH 值與氮源等，以下將依序介紹。

#### (1) 光

由於微藻具有光合自營的特性，故光照為其生長的重要限制因子。然而隨著色素種類與含量的差異，光合作用時吸收的光波長並不相同。藻類進行光合作用時並不能完全吸收全波長(380-750 nm)，只能吸收接近可見光的波長(400-750 nm)以進行光合作用，此波長範圍的光稱之為光合作用有效輻射(Photosynthetically active radiation, PAR)。依據光的(a)光強度與(b)光遮蔽來進行介紹(Masojidek et al., 2004)。

##### (a) 光強度

微藻的光合作用速率與光強度變化之關係可藉由光合作用光反應曲線圖(Photosynthesis-Light response curve)得知，其可分為光限制區、光飽和區與光限制區三個區域，如圖 2-2 所示(Masojidek et al., 2004)。

根據 Sandnes et al. (2005)的光強度對微藻成長速率之研究中顯示，若光強度範圍在  $30-80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  時，微藻的生長速率會隨光強度的增強而呈線性增加(Sandnes, 2005)，此為光限制區(Light limitation)。當光強度持續增加至某一程度

時，微藻的生長速率呈現平緩並達最高值，此為光飽和區(Light saturation)。若達光飽和區後又不斷增加光強度，過強的光能會破壞光反應中的 PS II (Photosystem II)，使微藻的生長速率開始下降，此為光抑制區(Light inhibition)。

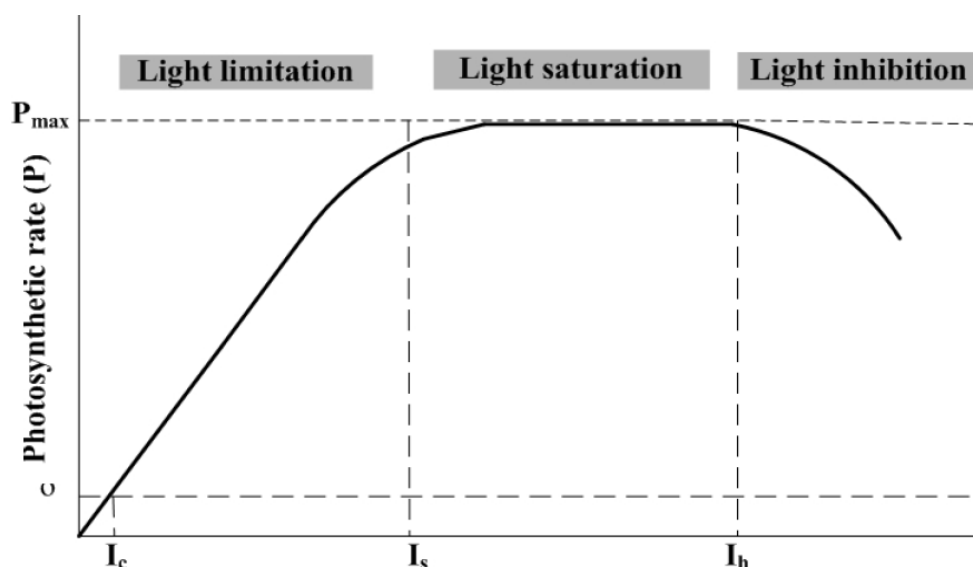


圖 2-2 光合作用效率與光照強度之關係圖(Masojidek et al., 2004)

### (b) 光遮蔽

在藻類培養系統中，光線所通過的路徑稱為光徑(Light-path)。根據文獻，光照強度隨著藻體濃度與光徑長度的增加而呈指數關係衰減(Suh et al., 2001)。當培養系統的光徑太長時，會使光線無法完全穿透藻液，造成部份區域完全沒有光線照射；或者隨著培養時間增加，藻類濃度上升，藻類彼此間會互相遮蔽光線(Mutual shading)，使得光線較難穿透藻液，只能照射到部份藻液，因此藻類培養系統可分成兩個區域：光線可到達的區域稱為光區，此區域的藻類可進行光合作用；而光線無法到達的區域稱為暗區，此區域藻類幾乎沒有光線可以利用，因此沒有光合作用發生(Richmond, 2004；孫, 2011；江, 2012)。

在光徑較短的反應器中，藻類受到充分的光照，故藻細胞濃度較高。但較低的培養體積，導致藻類產量不高。而在適當光徑長度下，藻類有最高的產量，代表在此光徑長度下，藻類具有最佳的光使用效率，而此光徑長度就稱為最適光徑 (Optimallight-path) (Goksan, 2003)。

## (2) 二氧化碳濃度

微藻體內的碳含量約40~50 %，故生成1公斤的微藻細胞，需要1.5~2.0公斤的二氧化碳，因此碳對於微藻的生長有重要的影響。自營的微藻本身能利用溶於水中的無機碳源，如 $\text{CO}_2$ 、 $\text{H}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 等進行生長。這些無機碳源的利用會因藻種和環境條件而有所差異，例如螺旋藻可利用 $\text{HCO}_3^-$ 作為碳源，而 $\text{CO}_2$ 則是微藻最普遍也是最通用的碳源。在高濃度的微藻培養條件下，培養基中碳源的需求亦會增加，而空氣中僅含0.03 %的 $\text{CO}_2$  (v/v)，且不易溶於水中，因此在培養系統中，常會通入 $\text{CO}_2$ 與空氣的混合氣體以提供藻類充足的碳源(謝等, 2009)。

## (3) 溫度

溫度的高低對生物體內的酵素作用有極大的影響，進而影響微藻的生長速率。一般而言，溫度過高會降低微藻光合作用的效率，且多元飽和脂肪酸含量會隨溫度上升而提高(Qiang Hu et al., 2008))，故多數的藻類無法忍受高溫的環境。而藻類在低溫條件下培養時，藻體內的多元不飽和脂肪酸比例會提升以維持細胞膜的流動性(Susan M. Renaud et al., 2002; Qiang Hu et al., 2008)，故適當的培養溫度範圍將有利於微藻的生長。

## (4) 鹽度

培養環境中鹽度的高低會影響培養液的滲透壓，並抑制光合作用中光系統II(PSII)的進行，導致微藻的生長與代謝受到抑制。對不同的藻類而言，鹽度亦



會影響其油脂含量與脂肪酸組成。文獻指出，隨著鹽度的增加，*Scenedesmus obliquus*的油脂累積量亦增加(Mohammed, 1992)。當鹽度濃度為34 mM與85 mM時，*Botryococcus braunii*的棕櫚酸(Palmitic acid)含量增加了1.7-2.25倍，油酸(Oleic acid)含量提高2倍，類胡蘿蔔素含量亦有2倍的增加(Rao et al., 2007)。

## (5) pH 值

多數的微藻都喜歡生長在中性pH值的環境，然而也有少數藻類可以耐高pH值或低pH值。在微藻生物反應系統中，CO<sub>2</sub>濃度與pH值間存在著複雜的關係，高濃度的CO<sub>2</sub>可以提高生物質量的產率，但過高的CO<sub>2</sub>濃度會導致培養基的pH值下降，對微藻的生長帶來負面影響。

在液體中的環境中，酸鹼度會直接影響二氧化碳存在於液體中的型態。在偏酸性的環境中，CO<sub>2</sub>以分子游離型態存在；而在偏中性或是鹼性時，則是以碳酸氫根(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)及碳酸根(CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>)的型態存在。如下所示： $CO_2 + H_2O \rightarrow H^+ + HCO_3^- \rightarrow 2H^+ + CO_3^{2-}$ 。當pH值愈低時，反應式會愈往CO<sub>2</sub>的方向進行；pH愈高時，愈往CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>方向進行，而微藻無法利用CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>(Philips, 1997)，如圖2-3。

從上述的結果得知，二氧化碳的型態不同，會影響藻類的吸收利用，進而影響藻類的生長。隨著微藻的生長，培養液中的CO<sub>2</sub>會被消耗掉，並同時產生氫氧根離子，造成培養基的酸鹼值逐漸變鹼，故在藻類的培養時，必須將CO<sub>2</sub>與酸鹼值間對微藻生長的影響列入考慮(潘忠政, 2001)。

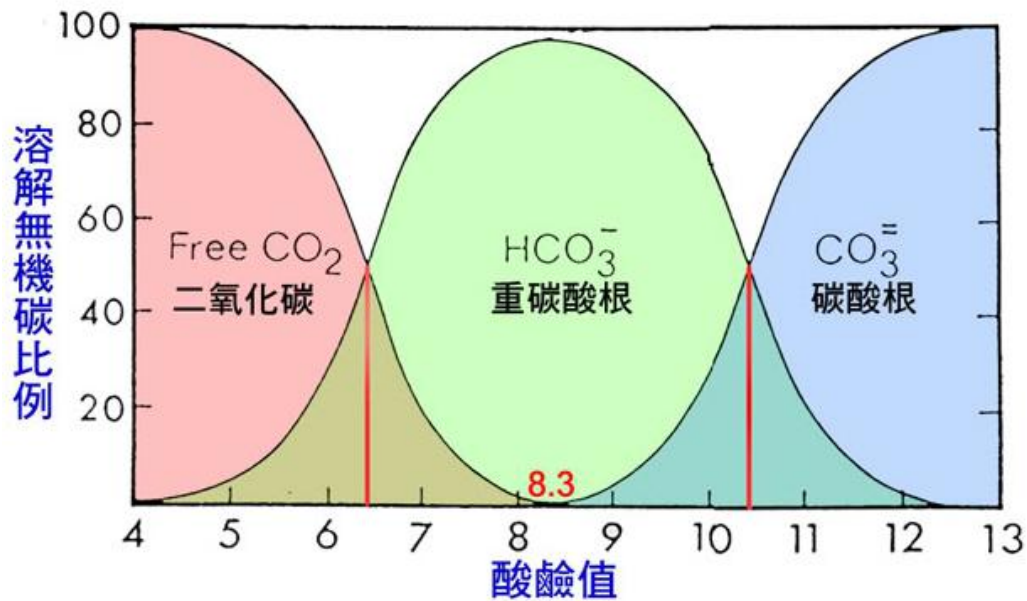


圖 2-3 溶解無機碳比例與酸鹼值關係圖(孫, 2011)

## (6) 氮源

氮源是構成藻體細胞的蛋白質、胺基酸、酵素、葉綠素與細胞膜等重要化合物的基本必要元素，隨著物種種類或營養源供應的不同，其在生物質量所佔之比例會因而不同，約佔藻體總乾重的 1-10 %。

在氮源限制條件下培養會使藻體內的葉綠素(Chlorophylls)含量下降，類胡蘿蔔素(Carotenoids)含量上升，造成細胞顏色的改變，並促進有機碳化合物的累積，如多醣(Polysaccharides)和特定的油脂(PUFAs)(Becker, 1994；Richmond, 2008)。

Mandal, 2009 研究中顯示，*Scenedesmus obliquus* 在氮源限制條件(N-deficiency)下培養，其油脂累積量自控制組的 12.7 % 上升至 43 %。而 Miao, 2004 在 *Chlorella protothecoides* 的培養亦有相同的結果，油脂的累積量自控制組的 15 % 上升至 55 % (Mandal, 2009)。

### 2.1.3. 微藻培養方式

依碳源種類和光源需要與否，藻類的生長方式可分為三種：(1)光自營培養；(2)異營培養；(3)混營培養。

#### (1) 光自營培養( Photoautotrophy)

於光照的環境下利用無機碳(以二氧化碳為主)作為碳源進行光合作用，由於陽光與二氧化碳皆可從大自然中獲得，故成本較低。幾乎所有的藻類皆可行光自營生長，因此目前大規模的培養方式主要仍以光自營培養為主。

#### (2) 異營培養(Heterotrophy)

在高密度培養下，某些藻類可以利用有機碳(以葡萄糖為主)作為建構細胞的主要碳源，提供生長所需的能量而不須藉光合作用得到能量。異營培養隨不會有光穿透度的問題，但額外添加有機碳造成成本的增加。

#### (3) 混營培養(Mixotrophy)

混營培養方式為光自營與異營培養之結合。即藻類可以使用有機碳源，並同時進行光合作用，此時光照與碳源皆為影響藻類生長的限制因子。一般而言，藻類於混營條件下的生長效果遠比異營條件佳，而異營條件又優於自營條件下的生長。

### 2.1.4. 柵藻(*Scenedesmus*)

柵藻一種普遍分布在淡水湖、河的微生物，為 5-10  $\mu\text{m}$  的單細胞微生物，常由 2 或 4 個細胞組成。微藻富含人體所需的營養物質，如蛋白質、胜肽、碳水化合物、脂質、維生素與其他微量元素，故可作魚餌飼料、食品與保健藥物，其中 *S. obliquus* 的組成為 50-56 % 的蛋白質、10-17 % 碳水化合物與 12-14 % 脂質 (Becker, 2007)。而乾燥後的藻粉由於顏色與味道，在食品的應用上較難被消費者

接受；相對其他蛋白質來源的食品，微藻有較高的製造成本，使的藻的應用以保健食品為主。由於微藻與重金屬有較高的親和性，故也常應用於污廢水的處理。柵藻含有類似植物油的組成，可作為生產生質能源之原料。藉由培養基組成或培養條件的改變，柵藻細胞的物理性質或化學性質會受到影響(Kim, 2007)。

在氮源限制的條件下，*S. obliquus*的油脂累積可以從控制組的12.7 %提升至43 %。在磷的限制條件或硫代硫酸鹽的添加下，油脂含量可以提高至30 % (Mandal, 2009)。Mohammed and Shafea, 1992 指出隨著NaCl的添加，光合作用所釋出的氧氣濃度有明顯的增加，且油脂的含量亦有提升的現象。

## 2.2. 酵母菌

酵母菌為單細胞的真核為生物，屬真菌類。以出芽生殖進行無性生殖，或透過孢子囊的孢子進行有性生殖。酵母菌在自然界分布廣泛，主要生長在偏酸性的潮濕含糖環境中。據統計，酵母菌約有七百多種以上，而常見的酵母菌大多能代謝葡萄糖，常被用於釀酒、食品、醫藥工業等領域。自 1980 年以來，由於酵母菌具有生長快速、快速累積油脂，與低成本的發酵培養基等特點(Angerbauer et al., 2008; Malisorn, 2008; Xue et al., 2006)，酵母菌更被視為有效的產油微生物之一。如 *Rhodospiridium sp.*、*Rhodotorula sp.*、*Lipomyces sp.*等，其油脂累積量可以高達 70 %。文獻亦指出，*Crptococcus curvatus* 在氮源受限的條件下，能累積的油脂高達 60%以上。

*R. glutinis* 的細胞型態為圓形或卵圓形，行無性多邊出芽生殖，但無酒精發

酵能力，其菌落顏色為紅色。*R. glutinis* 富含油脂與  $\beta$ -胡蘿蔔素，常作為  $\beta$ -胡蘿蔔素生產之菌種。文獻亦指出，*R. glutinis* 的油脂累積含量可以高達 72%，在生質能源的原料上受到關注。

### 2.3. 生物燃料(Biofuel)

自工業革命以來，各種石化燃料的使用造成各種污染的產生，使環境受到破壞，引發溫室效應、環境變遷等問題。又石化燃料為有限的資源，人類對其過度的使用與依賴，使其貯存量日漸枯竭，使石油價格上漲，這些問題的解決日趨迫切。其中引發溫室效應的溫室氣體又以二氧化碳為主，因此尋找可替代石化燃料的能源與節能減碳勢在必行。

生物燃料(Biofuel)為一生物可降解(Biodegradable)、無毒且乾淨的可再生能源，其具有類似傳統燃料的特性(Graboski, 1998; Williams, 2010; Zhu et al., 2008)。一般根據原料來源可分為生質乙醇(Bioethanol)、生質柴油(Biodiesel)、生質油(Bio-oil) (Demirbas, 2011 ; Demirbas, 2008; Ozkurt, 2009; Demirbas, 2010)。

生質乙醇又稱作生質酒精，一般是以玉米、蔗糖、穀物等糧食作物為原料經醱酵製得的，其中又以蔗糖為主。據文獻指出，全世界有 60% 的乙醇是從蔗糖醱酵而來的。而生質乙醇可取代汽油的使用，其需求量將在未來 10 年後倍增 (Demirbas, 2009)。生質柴油是以植物油、動物脂肪或食用廢油為原料經轉酯化程序(Transesterification Process)製得的，其中又以植物油為主，如油菜籽油(Rapeseed

oil)、大豆油(Soybean oil)、葵花油(Sunflower oil)、棕櫚油(Palm oil)等。近年來，生質柴油因為它的環境效益受到更多重視。生質柴油可以取代石化柴油的使用，汽車引擎不需修改或略作修改，亦或摻雜石化柴油即可使用。但是其原料大都來自糧食作物，其原料價格佔生質燃料成本的 70-85 % (Miao, 2006)，產量易受到氣候影響而不穩定，且未來可能會面臨與民爭食、與民爭地的窘境，使其在商業化、經濟效應上受到限制。故低成本、高生產力的生物質量作原料所製備的生質油(Bio-oil)日受關注(Balat, 2009; Demirbas, 2009; Fatih Demirbas, 2009; Keskin, 2010; Saidur, 2010)。

生質油(Bio-oil)是生物質量(Biomass)在缺氧且高溫的條件下熱裂解(Pyrolysis)成氣態、固態焦炭與液態的產物。富含油脂且生長快速的微生物(Angerbauer et al., 2008; Malisorn, 2008; Xue et al., 2006)，如細菌(Bacteria)、酵母菌(Yeast)、黴菌(Moulds)與藻類(Algae)含有類似植物油的脂肪酸組成，且相較植物油作原料，以富含油脂的微生物作原料並不受季節或氣候的影響，使其發展更具潛力，現今被視為深具潛力的生質能源原料。微生物的油脂累積量與脂肪酸組成如表 2-1 與 2-2。

表 2-1 部分微生物油脂累積量(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 微生物脂肪酸組成(Meng et al., 2009)

Microorganisms	Lipid composition (w/total lipid)					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Microalgae	12-21	55-57	1-2	58-60	4-20	14-30
Yeast	11-37	1-6	1-10	28-66	3-24	1-3
Fungi	7-23	1-6	2-6	19-81	8-40	4-42
Bacterium	8-10	10-11	11-12	25-28	14-17	-

## 2.4. 微生物油脂介紹

## 2.5. 影響油脂累積之環境因子

文獻指出，微生物在碳源過剩且氮源限制的條件下生長可以促進油脂的累積。而微生物的生長受培養基中的碳氮比(Carbon-to-nitrogen ratio)、溫度、pH 值、溶氧量與培養時間等因素的影響(張, 2011)。

### 2.5.2. 培養時間

油脂性微生物脂質的合成分為兩階段:第一階段的細胞生長期(Growth phase)與第二階的脂肪合成期(Production Phase)。細胞生長期具充分的營養，微生物的菌體量與油脂同時增加；在脂肪合成期時，當碳源充足而其他養分耗盡時，菌體會持續在體內累積脂肪酸；當碳源與其他養分皆耗盡時，某些微生物會自行分解體內脂質作為碳源使用。

### 2.5.3. 溫度

研究指出在低溫時微生物具有較高的不飽和脂肪酸生產能力。推測可能是微生物為了要適應低溫的環境而增加多元不飽和脂肪酸的生成。而溫度的高低亦會影響培養基中的溶氧量，較低的溫度有較高的溶氧量，進而影響菌體的生長與代謝。溫度會影響微生物的生長與脂質組成，當培養溫度提高時，可以促進微生物的生長，進而提高油脂的累積量。但當溫度高於 35 °C 時，不利 *Rhodotorula glutinis* 的生長；溫度低於 20 °C 時，菌體生長緩慢，故選擇適當的培養溫度對菌體的生長與油脂的累積是必要的。



#### 2.5.4. pH 值

培養基的酸鹼值會影響培養基裡養分的溶解度、細胞內外的離子平衡、滲透性與細胞膜結構的組成，進而影響菌體內酵素的反應與細胞的生長。文獻指出，在偏酸性的環境下，*Rhodotorula glutinis* 能有較高的油脂含量(Johnson et al., 1992)。

#### 2.5.5. 溶氧量

培養基中的溶氧濃度(Dissolved Oxygen, 簡稱 DO)對微生物的生長與產物的形成有著重要的影響，其會直接影響微生物的酵素活性、代謝途徑與產物產量。不同菌種的需氧量並不相同，隨著發酵階段的不同，所需的氧氣量也隨之改變。DO 因氧氣的質傳速率不同而改變，其主要是受發酵液中溶解的氧氣濃度和傳遞阻力等影響，故研究溶氧量對菌體生長的影響，並透過適當的控制以提高生產效率都是必要的(Zhang et al., 2007)。

#### 2.5.6. 光

光是植物行光合作用時不可或缺的元素，其光的強度、波長與穿透性皆會直接影響植物的生長與發育。光對微生物的生長與代謝同為重要。如微藻的生長亦需吸收光能進行光合作用，Westhuizen, 1985研究中顯示，*Microcystis aeruginosa* 在非常低的光強度下生長，其菌體產生的毒性量最小；而隨著光源強度增強到最高時，菌體產生的毒性量會開始減少。An, 1990 亦指出光對*Phaffia rhodozyma* 的生長與類胡蘿蔔素的合成有顯著的影響。*P. rhodozyma*於高的光強度下進行固

態培養時，生長會受到抑制，類胡蘿蔔素的產量降低且組成受到光源的影響有顯著的改變。大多數的酵母菌在進行液態培養時，雖然生長會因抗黴素(Antimycin)受到抑制，但可藉由光照降低抑制效應。Blumenstein et al., 2005發現將*Aspergillus nidulans*置於紅光下培養，內部的光敏素(Phytochrome)會受到刺激促使*A. nidulans*進行無性生殖而抑制有性生殖，顯示出光對於微生物的生長與代謝路徑有顯著的影響。

### 2.5.7. 碳源與氮源

碳源和氮源是微生物建構細胞時所需的成分。在碳源充足且氮源限制的條件下，微生物會將碳源轉為脂質儲存而不再增殖。Somashekar and Joseph 2000 研究亦顯示，當碳氮比例為 10:1 時，*Rhodotorula gracilis* 產生的類胡蘿蔔素是碳氮比例為 160:1 的 15 倍高；而在較高的碳氮比例時，*Rhodotorula gracilis* 的油脂累積量達 55 %，而較低的碳氮比例則為 20 %，顯示出碳氮源的含量對微生物的代謝產物有顯著的影響。因此，可藉適當的碳氮源比例來培養油脂性酵母菌，使其達到較高的油脂累積量。

### 2.6. 類胡蘿蔔素(Carotenoids)

類胡蘿蔔素是一種色彩鮮豔的黃紅色系脂溶性色素，由 40 個碳鍵鍵結且含有大量的共軛雙鍵(conjugated carbon-carbon double bonds)的萜類。分子間的共軛雙鍵能與自由基反應結合，形成良好的抗氧化劑。共軛雙鍵的數目愈多，類胡蘿蔔素的抗氧化性愈高(Heber D et al., 2002)，至今自然界有超過 700 種的類胡蘿蔔

素被鑑定出來，它廣泛存在於動物、植物和微生物中。由於在光合作用(Photosynthesis)與光保護作用(Photoprotection)上扮演重要的角色，故類胡蘿蔔素是一群深具價值的化合物(Demmig-Adams, 2002; Demmig-Adams, 1996)。類胡蘿蔔素具有廣泛的應用，如作為可食用的色素、抗氧化劑或過濾藍光保護眼睛(Bendich, 1989; Krinsky, 2003)。

根據化學結構，可將類胡蘿蔔素分成胡蘿蔔素(Carotene)和類葉黃素(Xanthophylls)兩大類。胡蘿蔔素(Carotene)為不含氧的碳氫化合物，可溶於石油醚、乙醚，而不溶於酒精，如 $\alpha$ -carotene、 $\beta$ -carotene、lycopene；類葉黃素(Xanthophylls)為胡蘿蔔素之含氧衍生物，可溶於酒精，但不溶於石油醚、乙醚，如 $\beta$ -cryptoxanthin、lutein、zeaxanthin(張雅琪, 2008)。

### 2.6.2. 葉黃素(Lutein)

葉黃素是 1945 年 Wald 於猴子視網膜內抽取出的黃斑色素，在自然界中與玉米黃素(Zeaxanthin)共同存在，兩者屬同質異構物，是存在於植物內的天然類胡蘿蔔素，屬類胡蘿蔔素(Carotenoids)中含氧的衍生物。

葉黃素((3R,3'R,6'R)- $\beta,\epsilon$ -carotene-3,3'-diol)又稱「植物黃體素」，分子量為 568.9 gmol<sup>-1</sup>，結構如圖 2-4。許多蔬果都含有葉黃素，如甘藍菜、菠菜、芥菜、深綠色花椰菜等十字花科類，及玉米、葡萄、奇異果、南瓜等。

葉黃素和玉米黃素的含量非常小，是人體在消耗後唯一可以被吸收而累積在人體視網膜中的類胡蘿蔔素(John et al., 2002)。當太陽光的紫外光進入眼睛，會



面積的投入，使得高葉黃素含量且生長快速的微藻開始備受重視。

微藻製備葉黃素有四個優勢：(1) 高葉黃素含量(0.5~1.2 % dry wt)；(2)不需投入大量人力分離藻體，微藻整體皆可進入萃取製程；(3)生長快速且產量不易受到氣候的影響；(4)微藻具有有價值的副產物，如蛋白質水解產物、其他色素、有價值的脂質等(Fernández-Sevilla et al., 2010)。

### 2.6.3. $\beta$ -胡蘿蔔素( $\beta$ -carotene)

$\beta$ -胡蘿蔔素為一直鏈型的碳氫化合物，內含 11 個共軛雙鍵與 2 個非共軛雙鍵，分子式為  $C_{40}H_{56}$ ，結構如圖 2-5。 $\beta$ -胡蘿蔔素是維生素 A 的前體(Granado, 2001)，屬橘黃色的脂溶性色素，可由胡蘿蔔、微藻、與棕櫚油等來源取得(楊, 2007；張, 2008)。

$\beta$ -胡蘿蔔素是種具抗氧化活性的類胡蘿蔔素，透過吸收活性氧的能量，或與脂質過氧化自由基結合而有良好的抗氧化力。 $\beta$ -胡蘿蔔素亦可與引起連鎖反應的脂質過氧基( $COO\cdot$ )作用而保護細胞膜不受自由基的破壞(Woodall et al., 1997)。天然的  $\beta$ -胡蘿蔔素價格昂貴，故市面上的食用  $\beta$ -胡蘿蔔素大都來自化學合成品。然而消費者仍偏愛天然的  $\beta$ -胡蘿蔔素，使快速生長、富含油脂與  $\beta$ -胡蘿蔔素的 *R. glutinis* 受到重視(Somashekar, 2000)。

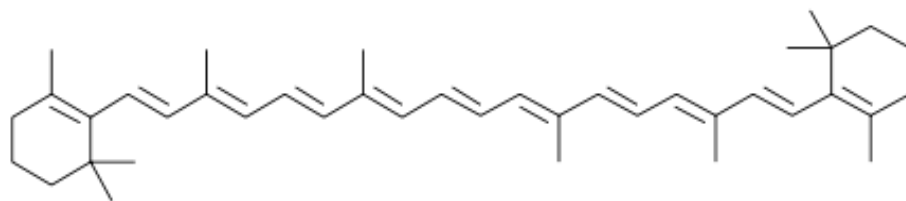


圖 2-5  $\beta$ -胡蘿蔔素結構(<http://zh.wikipedia.org/zh-tw>)

### 第三章 實驗材料與方法

#### 3.1. 實驗材料

##### 3.1.1. 藻種

本實驗使用的藻種為 *S. obliquus*，在生物分類學上為綠藻門(*Chlorophyta*)、綠藻綱(*Chlorophyceae*)、綠球菌目(*Chlorococcales*)、柵藻科(*Scenedesmaceae*)中的柵藻屬(*Scenedesmus*)。通常由兩個或四個綠藻細胞群聚而成，細胞外觀呈圓柱形、弦月形，其細胞壁是由纖維素所組成，質體(Plastids)內部因含葉綠素  $\alpha$ 、葉綠素  $\beta$  而成亮綠色，如圖 3-1。本實驗的藻種是由國立成功大學 張嘉修教授實驗室提供。

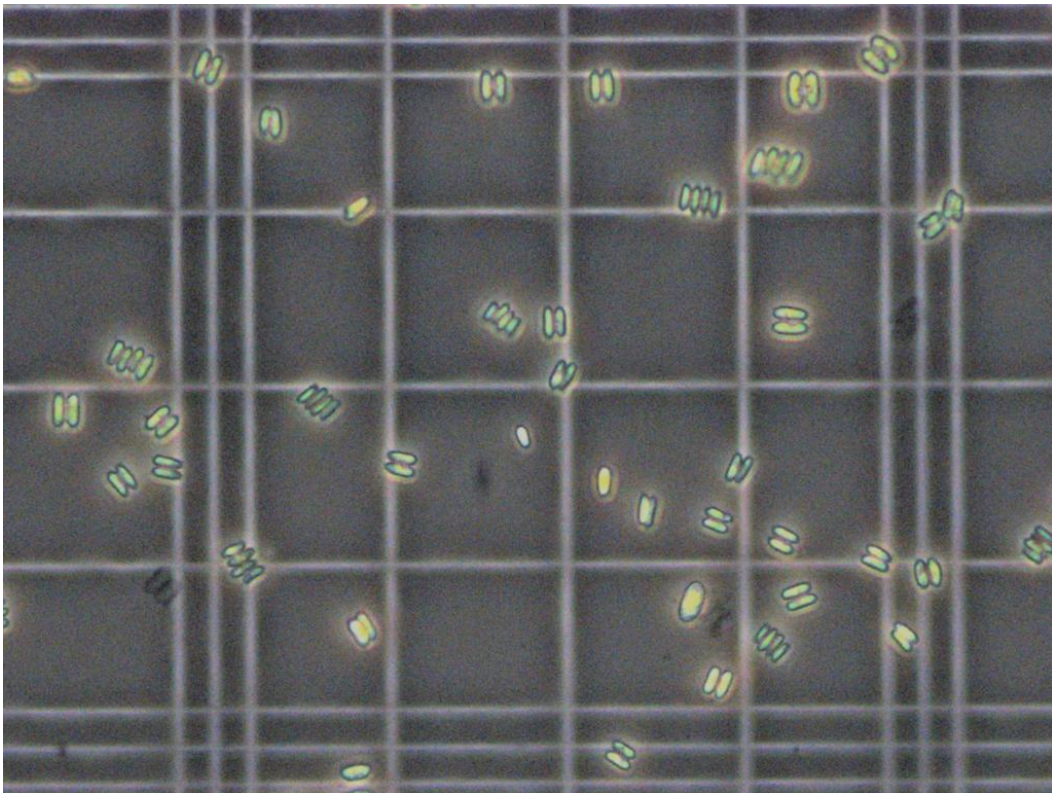


圖 3-1 *S. obliquus* 於顯微鏡下的外觀(200x)



### 3.1.2. 菌株

本實驗使用的菌株為 *R. glutinis*，菌種編號為 BCRC 22360，由國立虎尾科大  
生物科技系 張耀南教授所提供。

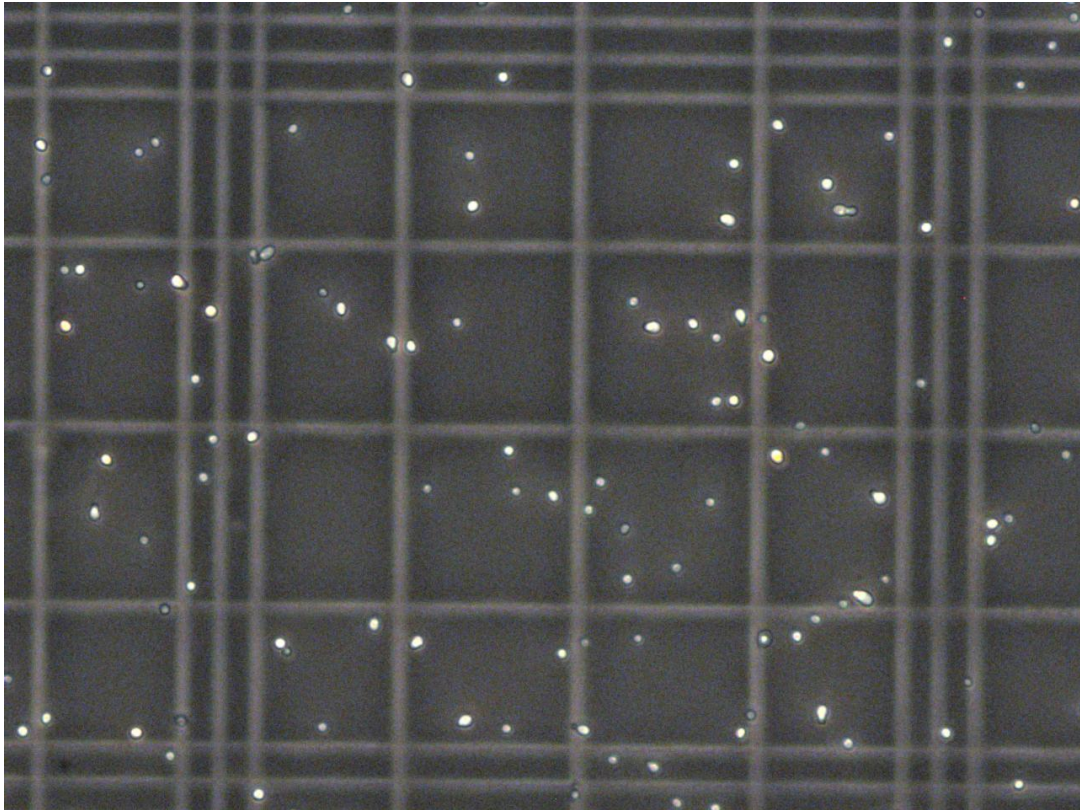


圖 3-2 *R. glutinis* 於顯微鏡下的外觀(200x)

### 3.1.3. 實驗藥品

表 3-1 實驗藥品清單

中文名	英文名	廠牌
硝酸鉀	Potassium nitrate	SHOWA
磷酸二氫鉀	Potassium dihydrogenphosphate	SHOWA
硫酸鎂	<i>Magnesium sulfate heptahydrate</i>	SHOWA
乙二胺四乙酸二鈉	Disodium dihydrogen ethylenediamine tetraacetate dihydrate	SHOWA
硼酸	Boric acid	SHOWA
氯化鈣	Calcium dichloride dihydrate	SHOWA
硫酸鐵	Ferrous sulfate	聯工化學試藥
硫酸鋅	<i>Zinc sulfate heptahydrate</i>	SHOWA
氯化錳	Manganese chloride tetrahydrate	Alfa
氧化鉬	Molybdenum(VI) oxide	SHOWA
硫酸銅	Copper sulfate pentahydrate	SHOWA
硝酸鈷	Cobalt(II) nitrate	SHOWA
硫酸銨	Ammonium sulfate	SHOWA
酵母萃取物	Yeast extract	DIFCO BD
氯化鈉	Sodium chloride	SHOWA
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	SHOWA
鹽酸	Hydrochloric acid	Scharlau
二氧化碳	Carbon oxides	晒輝氣體公司
甲醇	Methanol	ECHO



---

(接續前頁)

---

氯仿	Chloroform	ECHO
異丙醇	Isopropylalcohol	ECHO
乙酸乙酯	Ethyl acetate	ECHO
丙酮	Acetone	ECHO
乙腈	Acetonitrile	ECHO
正己烷	n-Hexane, 95%	TEDIA
肉豆蔻酸甲酯	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™
硬脂酸甲酯	Methyl stearate, 99%	Alfa Aesar
油酸甲酯	Methyl oleate	ACROS
亞麻油酸甲酯	Linolic 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 3-1 實驗儀器清單

儀器設備	型號	廠牌
pH meter	PH-206	Lutron
磁石攪拌加熱器	MS-3205B	ChromTech
電子天平	BJ 100M	Precisa
高壓蒸氣滅菌釜	EA635	TRIDENT
無菌操作台	3BH-24	HIGH TEN
超純水製造機	Simplicity	MILLIPORE
微電腦蒸餾水製造機	WSC044	FIDTREEM
微量離心機	MCD-2000	HSIANGTAI
高速中型離心機	Universal-32R	Hettich
試管震盪器	MS1 minishaker	IKA
超音波震盪器	DC300H	DECTA
冷凍乾燥機	CT-series	PAN CHUM
分光光度計	GENESYS 10UV	Thermo
紅外線水分蒸發儀	IR 35	DENVER INSTRUMENT
位相差顯微鏡	Model BX53	Olympus, Japan
烘箱	LO-150	LIAN SHEN
超音波細胞破碎儀	MISONIX	S-3000
高效能液相層析儀	Hitachi	L-2130
氣相層析儀	Thermo	Focus GC
濕式流量計	Sinagawa	W-NK-0.5

(接續前頁)

---

恆溫震盪培養箱	LIAN SHEN	LUS-150
5公升攪拌式發酵槽	頂生	
葡萄糖分析儀	YSI	2300STAT
光度計	LI-COR	LI-250A
T5 日光燈	T5-8W/D 110V	SUN
T5 日光燈座		SUN
LED燈	MR16-7W	

---

### 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  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

#### 3.3.2. 藻體濃度分析方法

以分光光度計找出 *S. obliquus* 的特徵波長，其波長位於 560 nm，並利用此波長去測量樣品吸光值(optical density, OD)。

#### 3.3.3. 菌體濃度分析方法

將菌液以蒸餾水稀釋至適當的濃度，使吸光值(optical density, OD)小於 1，並利用分光光度計在波長 660 nm 下測量其光學密度。

#### 3.3.4. 利用紅外線水分分析儀測量樣品濃度

1. 取 10ml 樣品置入冷凍離心機，轉速 7000rpm，10min，將樣品與培養液分離。
2. 將離心後的培養液去除，以 10ml 的蒸餾水清洗樣品並離心。
3. 以適當的蒸餾水與樣品均勻混合，置於鋁盤上。
4. 紅外線水分蒸發儀的條件設定：烘乾溫度 80-90 °C，將鋁盤放入紅外線水分蒸發儀內，烘乾以得到樣品乾重(Dry Cell Weight)。
5. 依柵藻與酵母菌之單位重量來計算其在樣品乾重中所佔之個別重量(附錄 A)。

### 3.3.5. 菌數分析方法

取稀釋適當的樣品液滴於血球計數器上，使菌液充滿計數器凹槽中，接著以顯微鏡觀察計算小方格內柵藻與酵母菌的數量，即可求得單位體積樣品之總菌數（個/ml 或個/cm<sup>3</sup>），如圖 3-3。

血球計數器的規格：凹槽上有一邊長 1mm 的正方形格子，該格內分為 25 個大方格(5×5)，每一大方格再細分為 16 個小方格(4×4)，因此每小方格的邊長為 0.05mm。在高度方面，蓋上蓋玻片後，玻片與計數器間的時間隔恰好為 0.1mm，故每小格的體積為 0.00025mm<sup>3</sup>(張, 2009)。

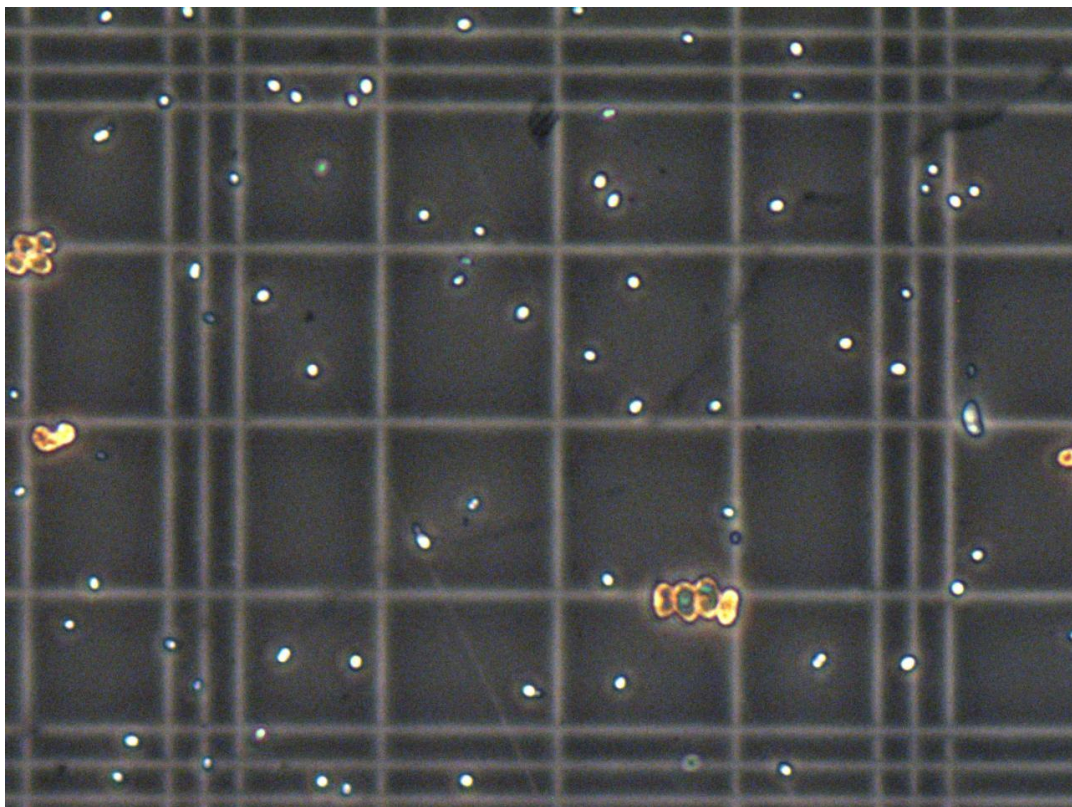


圖 3-3 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之顯微鏡圖 (200x)

### 3.3.6. 葡萄糖濃度分析方法

將樣品置入離心管中，用離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min，分離樣品和上清液。取上清液並利用 YSI 2300STAT Glucose analyzer 來量測。

### 3.3.7. 總脂質濃度分析方法

秤取冷凍乾燥後的樣品 50 mg，加入甲醇/氯仿(1:2)溶液 5 ml 以試管震盪器混合均勻，利用超音波破碎機破碎菌細胞(功率 5，作用時間 2 min)，靜置萃取 1 hr。再經由離心機以轉速 5000 rpm 離心 10 min。將上層萃取液收集於已秤重之鋁皿中，殘留之細胞再次以 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可得脂質量。

利用測得的脂質量除以秤取的生物質量(Biomass)，可求得單位質量所含的油脂累積量，即為油脂含量(%，w/w，Total lipid content)。將油脂含量(%，w/w)乘上樣品濃度(g/L)，即可計算出油脂累積的濃度(g/L，Total lipid)。

### 3.3.8. 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% BF<sub>3</sub>/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)

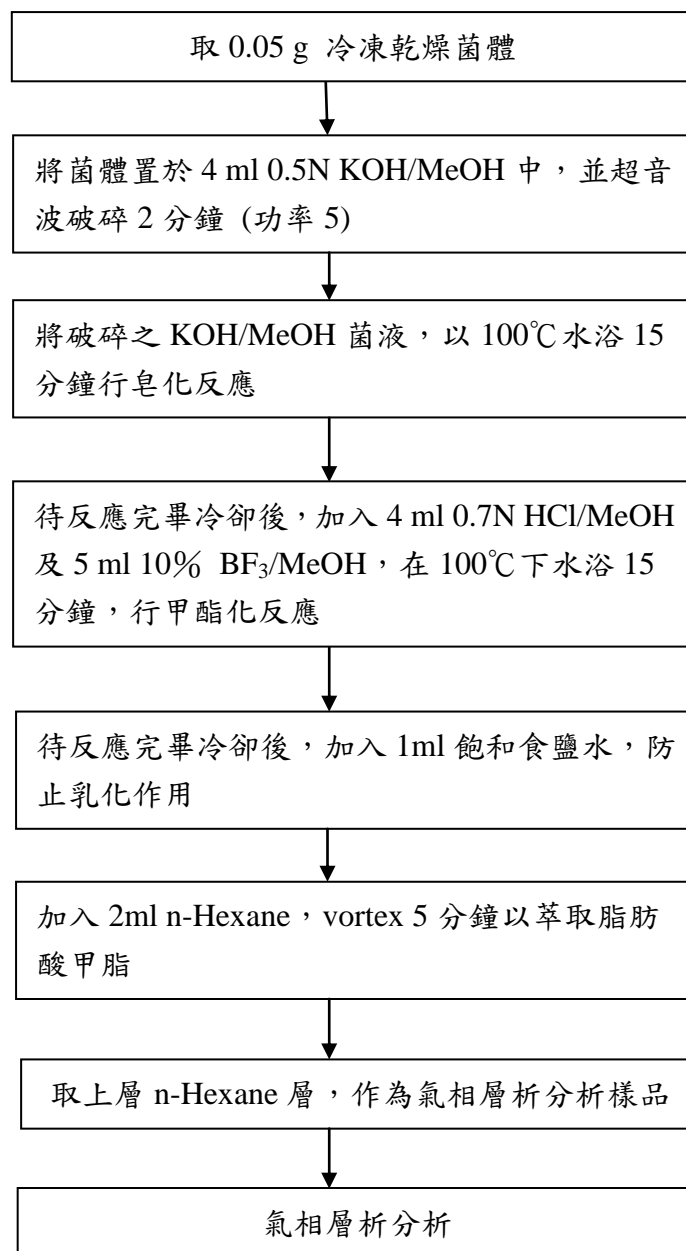


圖 3-4 脂肪酸分析之樣品前處理流程圖(張, 2011)



### 3.3.9. 葉黃素(Lutein)濃度測量方法(Tukaj et al., 2003)

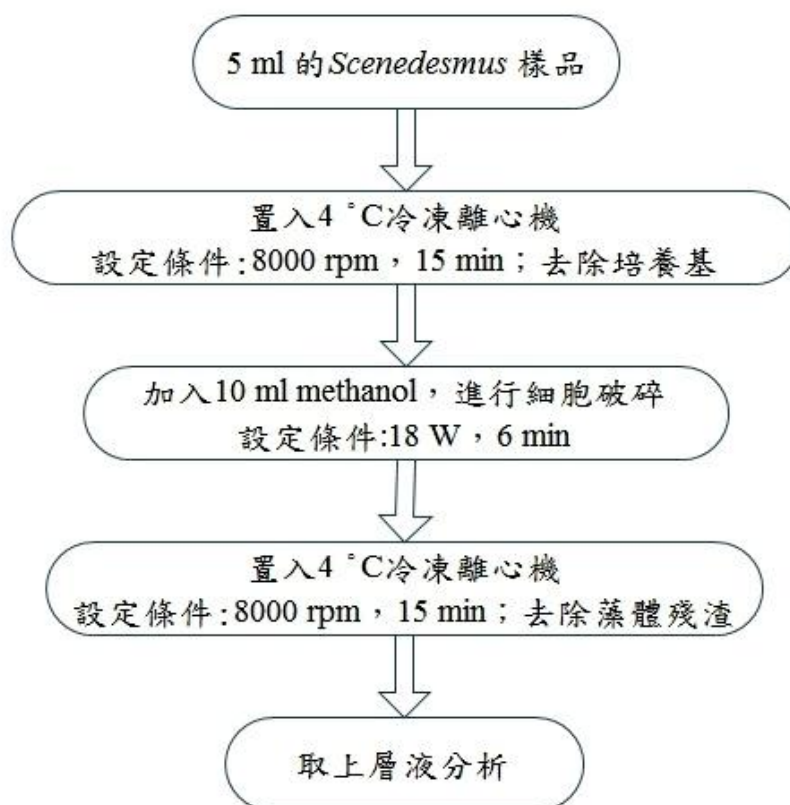


圖 3-5 葉黃素分析步驟(孫, 2011)

利用高效能液相層析儀(HPLC)進行分析，條件為:管柱5ODS (250 ×4.68 mm);溫度(27±1 °C);移動相起始60% solventA (acetonitrile/methanol,20/80 v/v)和40% solventB (methanol/acetone,80/20 v/v)梯度沖洗 15 min 至 30%solventA 和 70% solventB，最後沖洗6 min平穩至起始濃度；流速1 ml/min；UV偵測器450 nm。

葉黃素濃度對波峰面積作圖，獲得檢量線：

$$\text{Lutein : Concentration(mg/L)} = 4 \times 10^{-6} \times \text{Area (附錄 C)}。$$

### 3.3.10. 類胡蘿蔔素( $\beta$ -carotene)分析方法

1. 秤取冷凍乾燥後的樣品 50mg，加入 2ml(乙腈：異丙醇：乙酸乙酯 = 40：40：20, v/v)混合液。以試管震盪器混合均勻，並以超音波破碎機進行細胞破碎(功率 5，power 為 18W，作用時間 2min)，靜置小時。
2. 利用冷凍離心機以轉速 5000 rpm 離心 10min，取上清液於 0.45 $\mu$ m 針筒過濾器過濾。
3. 以高效能液相層析儀分析  $\beta$ -carotene 的濃度。
4. 高效能液相層析儀之分析條件：乙腈、異丙醇、乙酸乙酯之混合液(乙腈：異丙醇：乙酸乙酯 = 40：40：20, v/v)為移動相，流速 0.7 ml/min，管柱為 N5ODS (C-18) 4.6 MM i.d  $\times$  250 mm，偵測波長為 457nm。  
標準線為  $\text{Conc. (mg/L)} = 4 \times 10^{-6} \times \text{Area}$  (附錄 D)。

### 3.4. 實驗方法

#### 3.4.1. 藻種保存

本實驗中，藻種保存採繼代培養的方式。取50 ml 柵藻接種於含500 ml 培養基之血清瓶中進行培養，每週重新接種一次(約為停滯期初期)。培養條件：通氣量為1 vvm (2% CO<sub>2</sub>)，光照強度1600 μmole m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>，24小時連續照光，溫度約24-26 °C。

#### 3.4.2. 藻種活化

取藻種於500 ml 培養基進行藻種活化培養，藻種起始濃度控制在OD=0.100(約0.05 g 藻細胞)。當微藻生長進入對數生長期時(5-6天)，取出藻液作為實驗上主培養之藻種使用。培養條件：通氣量1 vvm (2% CO<sub>2</sub>)，光照強度1600 μmole photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>，24小時連續照光，溫度約24-26 °C。

#### 3.4.3. 菌種保存

將菌種 *R. 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。

#### 3.4.4. 接菌

*R. glutinis* 與 *S. obliquus* 起始接菌數分別為 6.00×10<sup>5</sup> 與 4.90×10<sup>6</sup>，接種於搖瓶中培養96小時。培養體積為50ml之共培養培養基，培養條件為150 rpm，24°C，光照強度 47μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>，25 g/L Glucose。

### 3.4.5. 培養基組成

#### 1. 藻種之培養基組成

*S. obliquus* 以 Basal 培養基作藻種保存與活化之培養，並作為共培養之柵藻

菌種備用，培養基組成如表 3-3。

表 3-3 Basal 培養基(Shi et al., 1997)

Components	Concentration(g/L)
KNO <sub>3</sub>	1.2500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2500
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0000
EDTA	0.5000
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.1142
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1110
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0498
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0882
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.0142
MoO <sub>3</sub>	0.0071
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0157
Co(NO <sub>3</sub> ) · 6H <sub>2</sub> O	0.0049
pH	6.0~6.1

## 2. 菌種之種子培養基組成

*R. glutinis* 依表 3-4 進行種子培養，培養 24 小時，作為共培養之酵母菌菌種。

表 3-4 種子培養基 (Seed Medium, SM)

Components	Concentration (g/L)
Yeast extract	3.0
Malt extract	3.0
Peptone	5.0
Dextrose	10.0
pH	5.5

## 3. 共培養培養基組成

*R. glutinis* 與 *S. obliquus* 依表 3-5 進行共培養實驗。

表 3-5 共培養培養基(Coculture Medium, CCM)

Components	Concentration(g/L)
KNO <sub>3</sub>	1.2500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0000
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5000
EDTA	0.5000
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.1142
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1000
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0498
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0882
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.0142
MoO <sub>3</sub>	0.0071
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0157
Co(NO <sub>3</sub> ) · 6H <sub>2</sub> O	0.0049
Yeast extract	2
Glucose	25
pH	6.0~6.1

### 3.5. 實驗架構

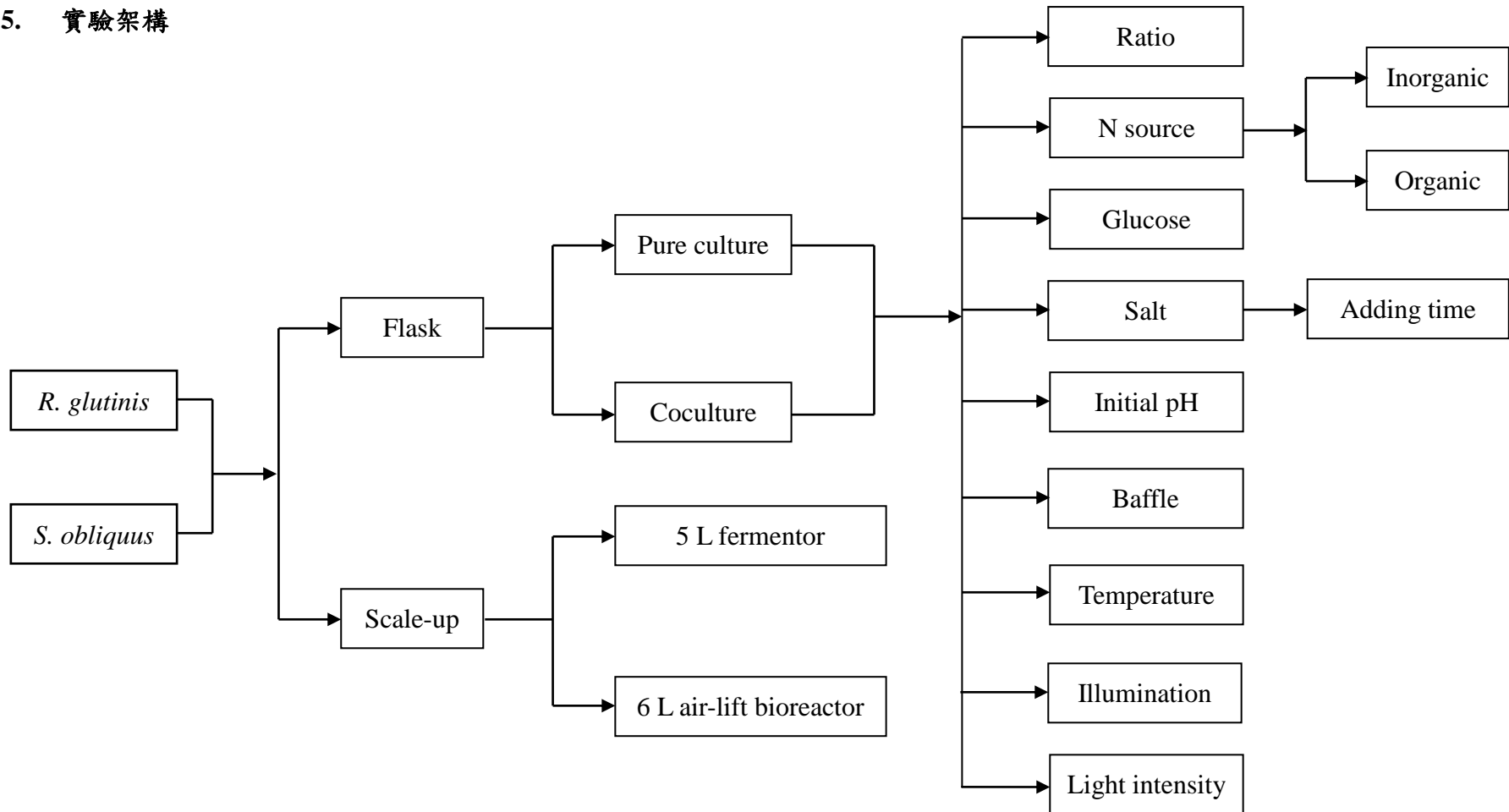


圖 3-6 實驗架構圖

### 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. 共培養(Coculture)對個別生長(Pure culture)之影響

目的：探討共培養對菌體生長與脂質累積之影響。

1. *S. obliquus* 於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於50 ml SM培養基培養24小時。
2. 於50 ml CCM 培養基中添加碳源濃度為25 g/L的葡萄糖。
3. (一)*R. glutinis* 以10% 接菌量接種於上述之CCM 培養基中。(二)將*S. obliquus* 前培養之種瓶濃縮至OD為32.08，取1ml 接種於上述之CCM 培養基中。(三)取OD為32.08之藻種1 ml，*R. glutinis* 以10% 接菌量接種於上述之CCM 培養基中。
4. 於24 °C、150 rpm、光強度 $47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之培養箱中培養96小時。

##### 3.6.1.2. 不同接菌比例之影響

目的：探討不同接菌比例(Algae/ Yeast = 8、41)對共培養菌體的生長與脂質累積之影響。

1. *S. obliquus* 於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於50 ml SM培養基培養24小時。
2. 於50 ml CCM 培養基中添加碳源濃度為25 g/L的葡萄糖。
3. *R. glutinis* 以10%接菌量接種於上述之CCM 培養基中，菌數為 $6.00 \times 10^5$ 。

4. *S. obliquus* 接種菌數分別為  $4.96 \times 10^6$ 、 $2.46 \times 10^7$ 。
5. 於 24 °C、150 rpm、光強度  $47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  之培養箱中培養 96 小時。

### 3.6.1.3. 氮源濃度之影響

#### (1) 無機氮源濃度之影響

目的：探討培養基中不同起始硝酸鉀濃度(0.5、0.75、1.25、1.5、2.0 g/L  $\text{KNO}_3$ )

對共培養菌體的生長與脂質累積之影響。

1. *S. obliquus* 於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於50 ml SM培養基培養24小時。
2. 於 50 ml CCM 培養基中各別添加 0.5、0.75、1.25、1.5、2.0 g/L  $\text{KNO}_3$ ，葡萄糖濃度為 25 g/L。
3. *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 接菌數分別為  $6.00 \times 10^5$ 、 $4.96 \times 10^6$ 。
4. 於 24 °C、150 rpm、光強度  $47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  之培養箱中培養 96 小時。

#### (2) 硫酸銨( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )添加之影響

目的：探討培養基中添加硫酸銨對共培養菌體的生長與脂質累積之影響。其

中  $\text{KNO}_3 / (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 5$ ，且起始  $\text{KNO}_3$  濃度為 0.5、1.25 g/L。

1. *S. obliquus*於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於50 ml SM培養基培養24小時。
2. 於 50 ml CCM 培養基中添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，其中  $\text{KNO}_3 / (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 5$ ， $\text{KNO}_3$  起始濃度為 0.5、1.25 g/L，葡萄糖濃度為 25 g/L。
3. *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 接菌數分別為  $6.00 \times 10^5$ 、 $4.96 \times 10^6$ 。



4. 於 24 °C、150 rpm、光強度  $47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  之培養箱中培養 96 小時。

### (3) 有機氮源之影響

目的：不同起始硝酸鉀( $\text{KNO}_3$ )濃度下，探討培養基中酵母萃取物(Yeast extract)添加與否對共培養菌體的生長與脂質累積之影響。

1. *S. obliquus*於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於50 ml SM培養基培養24小時。
2. 50 ml CCM 培養基中不添加 Yeast extract 之氮源，其中  $\text{KNO}_3$  起始濃度為 0.5、1.25 g/L，葡萄糖濃度為 25 g/L。
3. *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 接菌數分別為  $6.00 \times 10^5$ 、 $4.96 \times 10^6$ 。
4. 於 24 °C、150 rpm、光強度  $47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  之培養箱中培養 96 小時。

#### 3.6.1.4. 碳源濃度之影響

目的：探討不同起始葡萄糖濃度(25、35、50、100 g/L)對共培養菌體的生長與脂質累積之影響。

1. *S. obliquus*於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於50 ml SM培養基培養24小時。
2. 於 50 ml CCM 培養基中各別添加 25、35、50、100 g/L 葡萄糖。
3. *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 接菌數分別為  $6.00 \times 10^5$ 、 $4.96 \times 10^6$ 。
4. 於 24 °C、150 rpm、光強度  $47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  之培養箱中培養 96 小時。

### 3.6.1.5. 鹽度(NaCl)添加之影響

#### (1) 鹽度濃度之影響

目的：探討不同起始鹽度(0、0.05、0.1、0.2 g/L)對共培養菌體的生長、脂質累積、葉黃素(Lutein)與β-胡蘿蔔素(β-carotene)之影響。

1. *S. obliquus*於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於50 ml SM培養基培養24小時。
2. 於50 ml CCM 培養基中各別添加0、0.05、0.1、0.2 g/L的NaCl，葡萄糖濃度為25 g/L。
3. *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 接菌數分別為  $6.00 \times 10^5$ 、 $4.96 \times 10^6$ 。
4. 於24 °C、150 rpm、光強度  $47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  之培養箱中培養96小時。

#### (2) 鹽度添加時間之影響

目的：探討不同時間下添加0.05 g/L NaCl對共培養菌體的生長、脂質累積、葉黃素(Lutein)與β-胡蘿蔔素(β-carotene)之影響。

1. *S. obliquus* 於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於50 ml SM培養基培養24小時。
2. 培養24、48、72小時時，於50 ml CCM 培養基中添加0.05 g/L的NaCl，起始葡萄糖濃度為25 g/L。
3. *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 接菌數分別為  $6.00 \times 10^5$ 、 $4.96 \times 10^6$ 。
4. 於24 °C、150 rpm、光強度  $47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  之培養箱中培養96小時。

#### 3.6.1.6. 起始 pH 值之影響

目的：探討不同起始 pH 值(6、7、8)對共培養菌體的生長與脂質累積之影響。

1. *S. obliquus* 於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於50 ml SM培養基培養24小時。
2. 將 50 ml CCM 培養基之 pH 於滅菌前分別調整為 6、7、8，起始葡萄糖濃度為 25 g/L。
3. *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 接菌數分別為  $6.00 \times 10^5$ 、 $4.96 \times 10^6$ 。
4. 於 24 °C、150 rpm、光強度  $47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  之培養箱中培養 96 小時。

#### 3.6.1.7. 檔板之影響

目的：探討檔板對共培養菌體的生長與脂質累積之影響。

1. *S. obliquus* 於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於50 ml SM培養基培養24小時。
2. 使用含凹槽的三角搖瓶進行 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 之共培養，CCM 培養基 50 ml，起始葡萄糖濃度為 25 g/L。
3. *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 接菌數分別為  $6.00 \times 10^5$ 、 $4.96 \times 10^6$ 。
4. 於 24 °C、150 rpm、光強度  $47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  之培養箱中培養 96 小時。

#### 3.6.1.8. 溫度之影響

目的：探討不同培養溫度(22、24、26 °C)對共培養菌體的生長與脂質累積之影響。

1. *S. obliquus* 於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於

50 ml SM培養基培養24小時。

2. 於 50 ml CCM 培養基中進行培養，葡萄糖濃度為 25 g/L。
3. *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 接菌數分別為  $6.00 \times 10^5$ 、 $4.96 \times 10^6$ 。
4. 於 150 rpm、光強度  $47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  之培養箱中培養 96 小時，溫度分別為 22、24、26 °C。

#### 3.6.1.9. 光照之影響

目的：探討不同光強度( $47$ 、 $86$ 、 $115 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )對共培養菌體的生長與脂質累積之影響。

1. *S. obliquus* 於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於 50 ml SM培養基培養24小時。
2. 於 50 ml CCM 培養基中進行培養，葡萄糖濃度為 25 g/L。
3. *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 接菌數分別為  $6.00 \times 10^5$ 、 $4.96 \times 10^6$ 。
4. 於 24 °C、150 rpm 之培養箱中培養 96 小時，光強度分別為 0、 $47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

#### 3.6.1.10. 光強度之影響

目的：探討不同光強度( $47$ 、 $86$ 、 $115 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )對共培養菌體的生長與脂質累積之影響。

5. *S. obliquus* 於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於 50 ml SM培養基培養24小時。
6. 於 50 ml CCM 培養基中進行培養，葡萄糖濃度為 25 g/L。

7. *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 接菌數分別為  $6.00 \times 10^5$ 、 $4.96 \times 10^6$ 。
8. 於  $24^\circ\text{C}$ 、150 rpm 之培養箱中培養 96 小時，光強度分別為 47、86、115  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

### 3.6.2. 攪拌式發酵槽批次程序

目的：探討增加  $\text{CO}_2$  的通氣量對共培養之生物質量(Biomass)與油脂累積 (Total lipids)之影響。

1. *S. obliquus* 於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於50 ml SM培養基培養24小時。
2. 於含 2L CCM 培養基的 5 L 發酵槽中進行培養，葡萄糖濃度為 25 g/L。  
發酵槽的槽體為玻璃製的，其內直徑為 10cm，反應器高度 100 cm。
3. *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 接菌數分別為  $6.00 \times 10^5$ 、 $4.96 \times 10^6$ 。
4. 溫度  $24^\circ\text{C}$ ，進氣為空氣(0.03%  $\text{CO}_2$ )與 2%  $\text{CO}_2$ 之混合氣，通氣量 0.5 vvm，  
提供三盞光強度  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  之 LED 燈，於 24 小時後以 1N NaOH  
監控 pH 於 6.0。每 12 小時取樣一次，培養 96 小時。

### 3.6.3. 6 L 氣舉式發酵反應器 (Air-lift bioreactor)

1. *S. obliquus* 於500 ml血清瓶進行前培養，培養五天；*R. glutinis* 接種於50 ml SM培養基培養24小時。
2. 於含 3L CCM 培養基的 6 L 氣舉式發酵反應器中進行培養，葡萄糖濃度為 25 g/L。發酵槽的槽體為壓克力製的，其內直徑為 17 cm，反應器高度 32 cm。
3. *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 接菌數分別為  $6.00 \times 10^5$ 、 $4.96 \times 10^6$ 。
4. 溫度 24°C，空氣通氣量 0.5 vvm (0.03% CO<sub>2</sub>)，提供三盞光強度 1600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  之 LED 燈，每 24 小時取樣一次，培養 96 小時。

### 3.7. 實驗裝置圖

#### 3.7.1. 500 ml反應器設備圖

4. 取藻種於500 ml培養基進行藻種活化培養，藻種起始濃度控制在OD=0.100(約0.05 g藻細胞)。當微藻生長進入對數生長期時(5-6天)，取出藻液作為實驗上主培養之藻種使用。培養條件：通氣量1 vvm (2% CO<sub>2</sub>)，光照強度1600  $\mu\text{mole photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，24小時連續照光，溫度約24-26 °C。

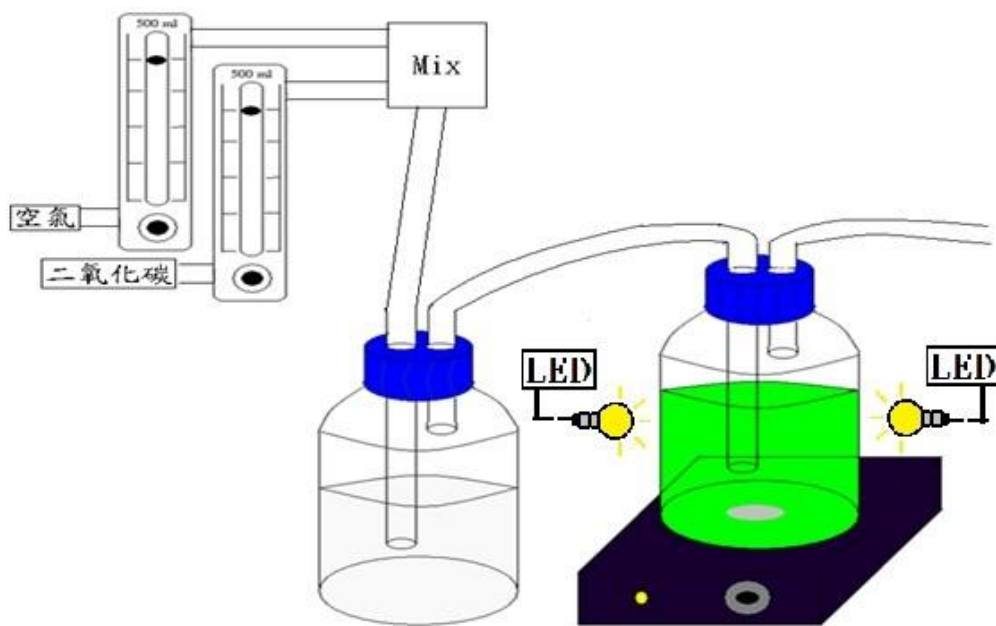


圖 3-7 500 ml 反應器設備圖(孫,2011)

### 3.7.1 共培養之搖瓶實驗裝置圖



圖 3-8 共培養之搖瓶實驗裝置圖



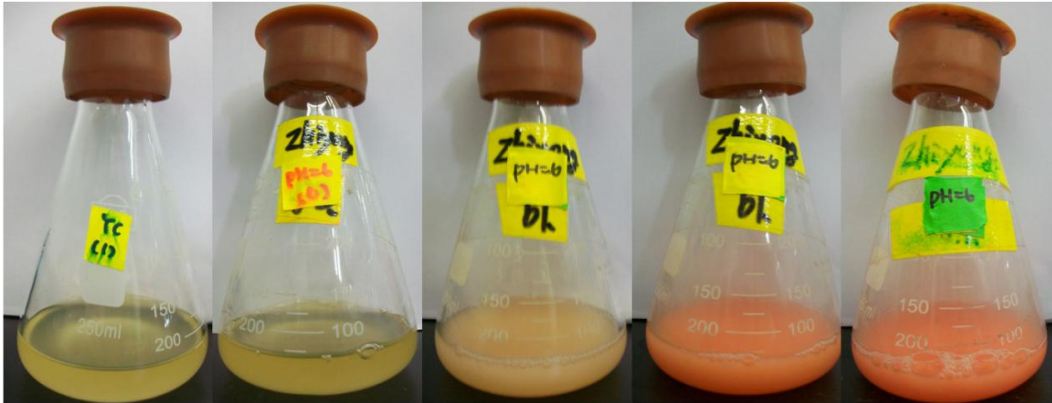


圖 3-9 單獨培養 *R. glutinis* 96 小時之變化情形

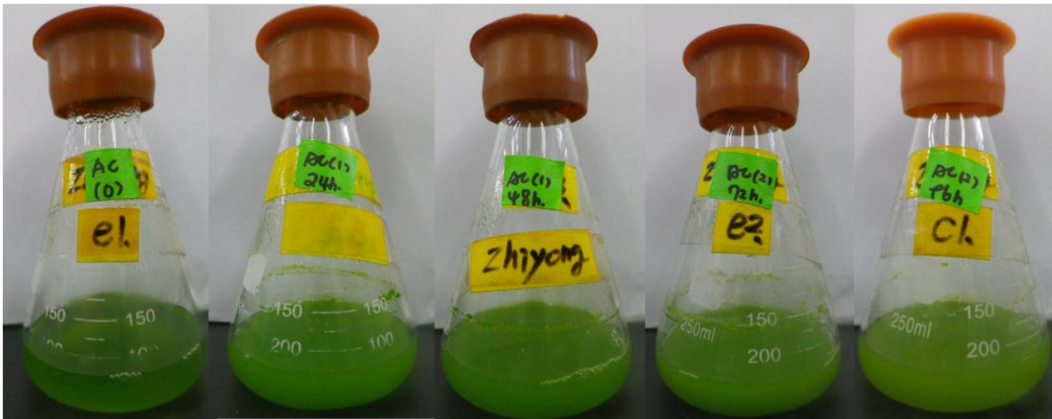


圖 3-10 單獨培養 *S. obliquus* 96 小時之變化情形



圖 3-11 共培養 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 小時之變化情形

### 3.7.2 5L 發酵槽與 6L 氣舉式發酵槽裝置圖

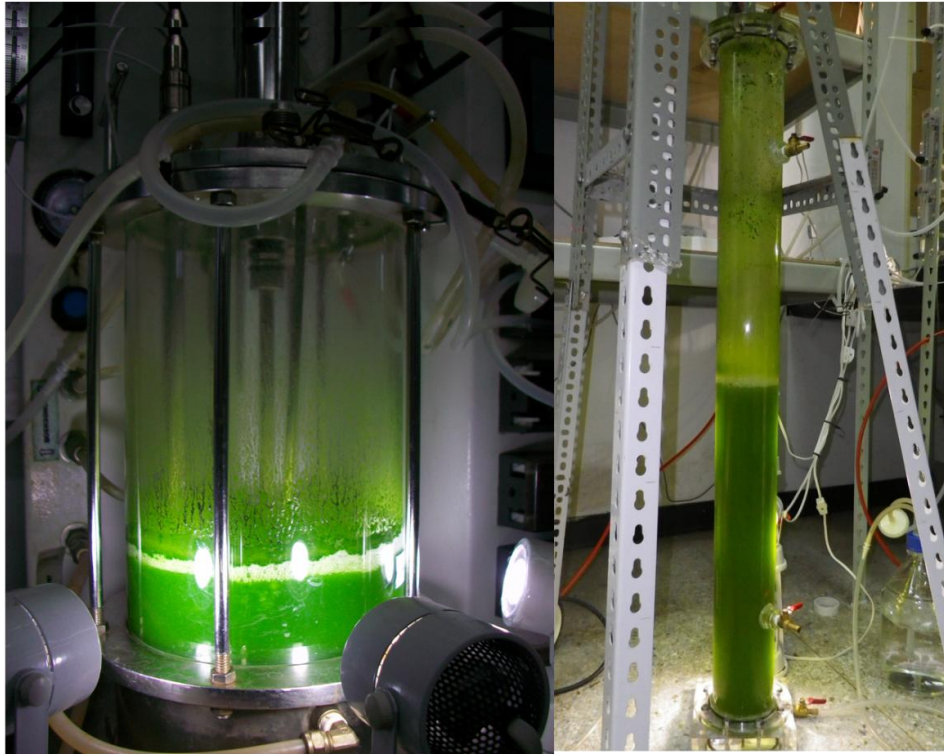


圖 3-12 5L 發酵槽與 6L 氣舉式發酵槽之裝置圖

## 第四章 實驗結果與討論

### 4.1. 搖瓶批次發酵程序 (Flask experiment)

#### 4.1.1. 共培養(Coculture)對個別生長(Pure culture)之影響

在相同培養基下，*R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養與單獨培養之比較如圖 4-1、4-2、4-3，其菌數如表 4-1。從表 4-1 中得知 *R. glutinis* 在單獨培養下其菌數較共培養時高，其推測是因為培養基的碳源為葡萄糖，*S. obliquus* 進行混營與 *R. glutinis* 競爭碳源，*R. glutinis* 所能使用的葡萄糖降低，造成較低的菌數。而 *S. obliquus* 在共培養下其菌數較單獨培養時提高了 16 倍，顯示出共培養為 *S. obliquus* 提供了一個較適合的培養環境。

如圖 4-1，*R. glutinis* 在單獨培養時可以得到的生物乾重為  $11.1 \pm 0.44$  g/L，*S. obliquus* 為  $2.0 \pm 0.06$  g/L，共培養下為  $14.05 \pm 0.07$  g/L。共培養下，依單獨培養之單位重量換算，*R. glutinis* 與 *S. obliquus* 其生物乾重分別為 2.46、11.59 g/L，顯示出 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養的效果較 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 單獨培養好，而共培養的環境對 *S. obliquus* 的生長有顯著的幫助。Cheirsilp et al., 2011 中共培養 *Rhodotorula glutinis* 和 *Chlorella vulgaris* 亦顯示出共培養的效果優於單獨培養的；Xue et al., 2010 共培養 *Spirulina platensis* 與 *Rhodotorula glutinis* 亦有相同的結果。

如圖 4-2，*R. glutinis* 在單獨培養時累積的油脂為  $1.777 \pm 0.278$  g/L，*S. obliquus* 為  $0.370 \pm 0.015$  g/L，共培養下為  $3.594 \pm 0.251$  g/L，其油脂累積量為 *R. glutinis*

的 2.02 倍，為 *S. obliquus* 的 9.71 倍。*R. glutinis* 的油脂含量為  $16.00 \pm 2.21\%$ ，*S. obliquus* 為  $18.71 \pm 0.22\%$ ，而共培養則提升至  $25.57 \pm 1.65\%$ 。*R. glutinis* 單位葡萄糖轉換成油脂的產率為  $0.071 \text{ gg}^{-1}$ ，*S. obliquus* 為  $0.0209 \text{ gg}^{-1}$ ，而共培養條件下提升至  $0.120 \text{ gg}^{-1}$ ，葡萄糖轉換成油脂的轉化率較單獨培養提高，顯示出共培養的環境利於油脂的累積。

表 4-1 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 於單獨培養與共培養下之菌數值

Culture condition	Cell count after 96 hr. (cells/mL)		ratio ( yeast / algae)
	Yeast	Microalga	
Pure yeast	$9.21 \times 10^8$	-	
Pure algae	-	$2.08 \times 10^6$	
Mixed culture	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17

◆ *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 接菌數分別為  $6.00 \times 10^5$ 、 $4.96 \times 10^6$  個/ml。

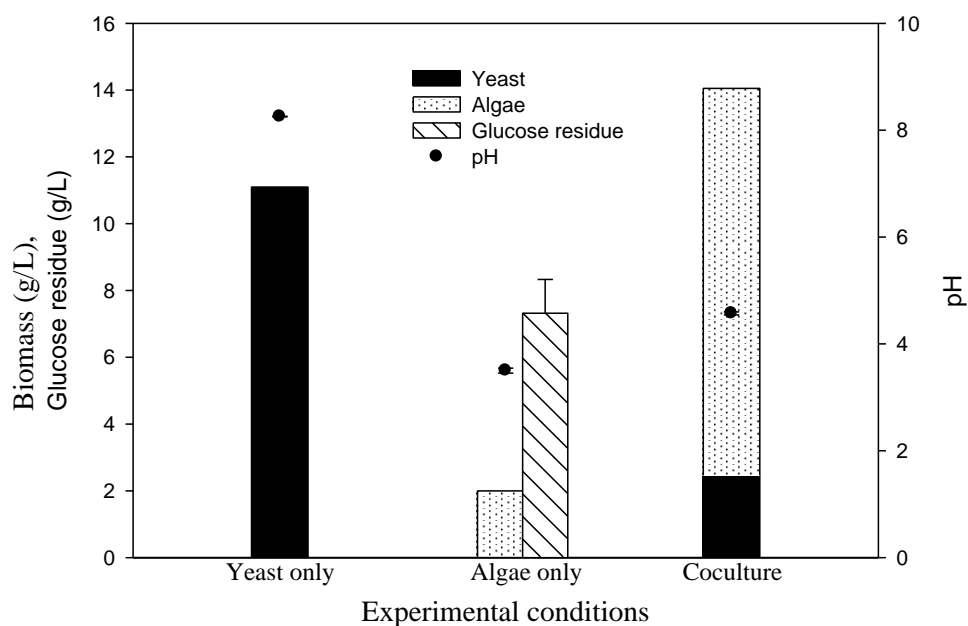


圖 4-1 共培養對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 之生長之影響

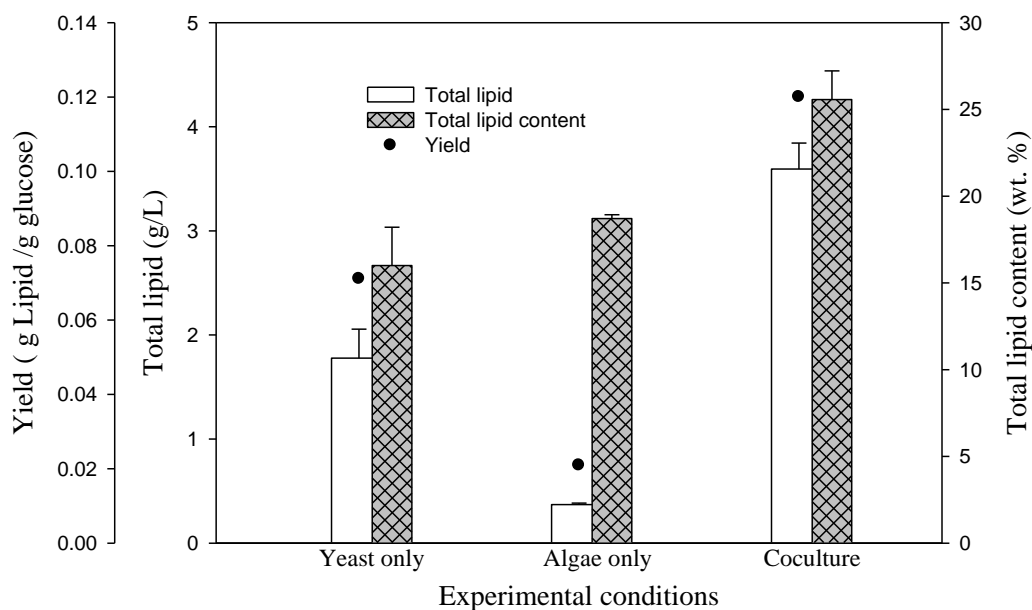


圖 4-2 共培養對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 之油脂累積的影響

分別將單獨培養下的 *R. glutinis* 與 *S. obliquus*，與共培養下的樣品經 3.3.8. 之處理步驟，從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，結果如表 4-2 所示。藉由脂肪酸組成的分析，可以了解單獨培養與共培養條件對脂肪酸組成之影響。

從表 4-2 中發現，不論 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 單獨培養，抑或共培養條件下，棕櫚酸甲酯 C16:0 (Methyl palmitate) 和油酸 C18:1 (Methyl oleate) 皆為主要的脂肪酸組成，其組成可作為生質柴油的原料 (Mandal, 2009)；Cheirsilp et al., 2011 中共培養 *R. glutinis* 和 *Chlorella vulgaris* 亦有相同的結果；Kim et al., 1996 亦指出，微藻在適合生長的環境下有較高的 C16:0、C18:1，*R. glutinis* 的 C16:0、C18:1 含量總和為 84.68 %；*S. obliquus* 為 83.14 %；共培養則為 90.99 %。

從圖 4-3 得知，單獨培養 *R. glutinis* 所得的葉黃素與  $\beta$ -胡蘿蔔素含量分別為 0.003 mg/g、0.0374 mg/g，*S. obliquus* 分別為 0.2447 mg/g、0.0991 mg/g，共培養下則為 0.084 mg/g、0.0321 mg/g。由於共培養之細胞乾重中含有低葉黃素含量的酵母菌，使整體葉黃素濃度被稀釋，圖 4-3 顯示共培養並不利於葉黃素與  $\beta$ -胡蘿蔔素的累積。

表 4-2 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 於單獨培養與共培養下之脂肪酸組成

Experimental conditions	Relative amount of total fatty acids (% w/w)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Yeast	0.47	10.16	0.21	2.64	74.52	9.09	2.92
Algae	0.35	16.36	0	1.80	66.78	11.93	2.79
Coculture	0.47	7.93	0.52	3.08	83.06	4.60	0.33

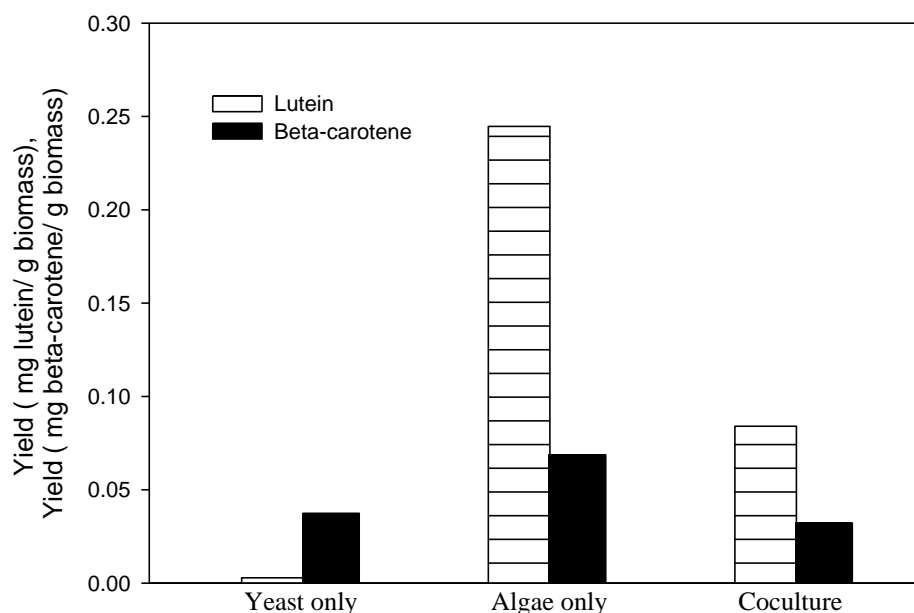


圖 4-3 共培養對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 之葉黃素與  $\beta$ -胡蘿蔔素累積的影響

#### 4.1.2. 不同接菌比例之影響

從圖 4-4、4-5 得知，當 Algae/ Yeast 為 8 時，其生物乾重、累積的油脂與油脂含量分別為  $14.05 \pm 0.071$  g/L、 $3.594 \pm 0.25$  g/L、 $25.57 \pm 1.65$  %。當 Algae/ Yeast 為 41 時，則為  $16.05 \pm 1.626$  g/L、 $4.235 \pm 1.24$  g/L、 $28.85 \pm 2.77$  %。單位葡萄糖轉換成油脂的產率分別為  $0.120$  gg<sup>-1</sup>、 $0.134$  gg<sup>-1</sup>，並沒有因起始接菌量不同而有明顯的差異，生物乾重的略增可能是由於較高的起始接菌量所造成的，而油脂的略增是由於略高的生物乾重。培養 96 小時後，Yeast/ Algae 的菌數比則為 17 與 24，圖表 4-3，顯示出 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 起始的接菌比例對共培養的影響並不顯著；該結果與 Cheirsilp et al., 2011 共培養 *R. glutinis* 與 *C. vulgaris* 相同。

表 4-3 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 於不同接菌比例下之菌數值

Initial ratio of Algae/ Yeast	Cell count after 96 hr. (cells/mL)		ratio ( yeast / algae)
	Yeast	Microalga	
8	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17
41	$6.55 \times 10^8$	$2.75 \times 10^7$	24

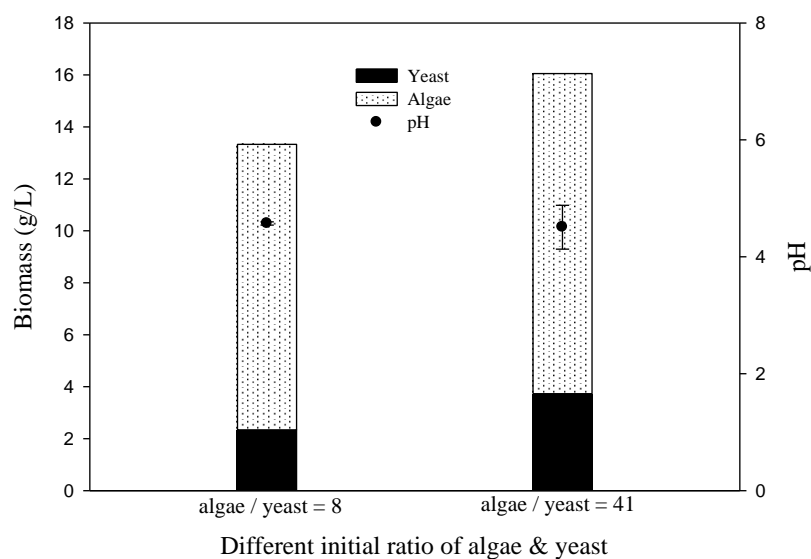


圖 4-4 不同接菌比例對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之生長之影響

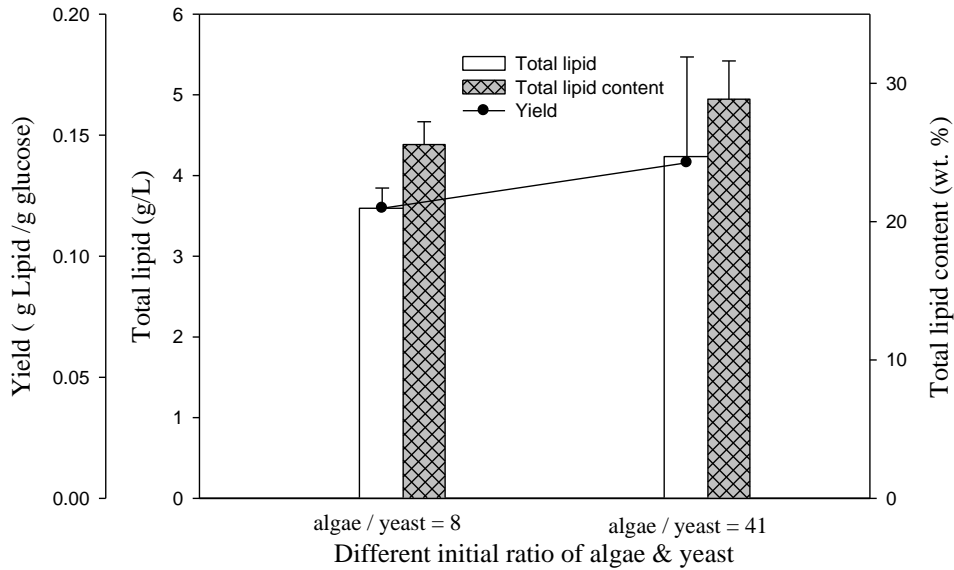


圖 4-5 不同接菌比例對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之油脂累積的影響

#### 4.1.3. 氮源濃度之影響

##### (1) 無機氮源濃度之影響

以 1.25 g/L  $\text{KNO}_3$  作為控制組，依序探討不同  $\text{KNO}_3$  濃度對共培養影響之實驗。從圖 4-6 得知，無機氮源( $\text{KNO}_3$ )的增加可以促進微藻的生長，但當  $\text{KNO}_3$  濃度超過 1.5 g/L 時，*S. obliquus* 的生長受到抑制，使 *R. glutinis* 比例略微提高；由於 *R. glutinis* 單位菌重小於 *S. obliquus* 的，使生物質量略為下降。較低的  $\text{KNO}_3$  濃度，*S. obliquus* 的菌數較小，使 *R. glutinis* 的菌數量提高，其菌數分布如表 4-4，顯示出  $\text{KNO}_3$  濃度的改變會影響共培養 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 菌數的比例。隨著  $\text{KNO}_3$  濃度的改變，對生物質量總值變化並不大，其中以 1.25 g/L  $\text{KNO}_3$  與 0.5 g/L  $\text{KNO}_3$  有較高的生物質量，分別為  $14.05 \pm 0.071$  g/L、 $13.33 \pm 0.850$  g/L。



當  $\text{KNO}_3$  濃度高於 1.5 g/L 時，其油脂的累積明顯下降，但油脂含量皆約為 25 %。其中以 1.25 g/L  $\text{KNO}_3$  有最高的油脂累積，為  $3.594 \pm 0.25$  g/L，其次是 0.5 g/L  $\text{KNO}_3$ ，為  $3.392 \pm 0.187$  g/L。而單位葡萄糖轉換成油脂的產率最高為 0.5 g/L  $\text{KNO}_3$  的  $0.136 \text{ gg}^{-1}$ ，可能是 *R. glutinis* 菌數比例的增加，其油脂的產率為  $0.071 \text{ gg}^{-1}$  高於 *S. obliquus* 的  $0.021 \text{ gg}^{-1}$ 。

表 4-4 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 於不同起始  $\text{KNO}_3$  濃度之菌數值

$\text{KNO}_3$ (g/L)	Cell count after 96 hr. (cells/mL)		ratio ( yeast / algae)
	Yeast	Microalga	
0.50	$7.84 \times 10^8$	$1.83 \times 10^7$	43
0.75	$7.02 \times 10^8$	$2.10 \times 10^7$	33
1.25	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17
1.50	$4.61 \times 10^8$	$2.20 \times 10^7$	21
2.00	$6.08 \times 10^8$	$2.23 \times 10^7$	27

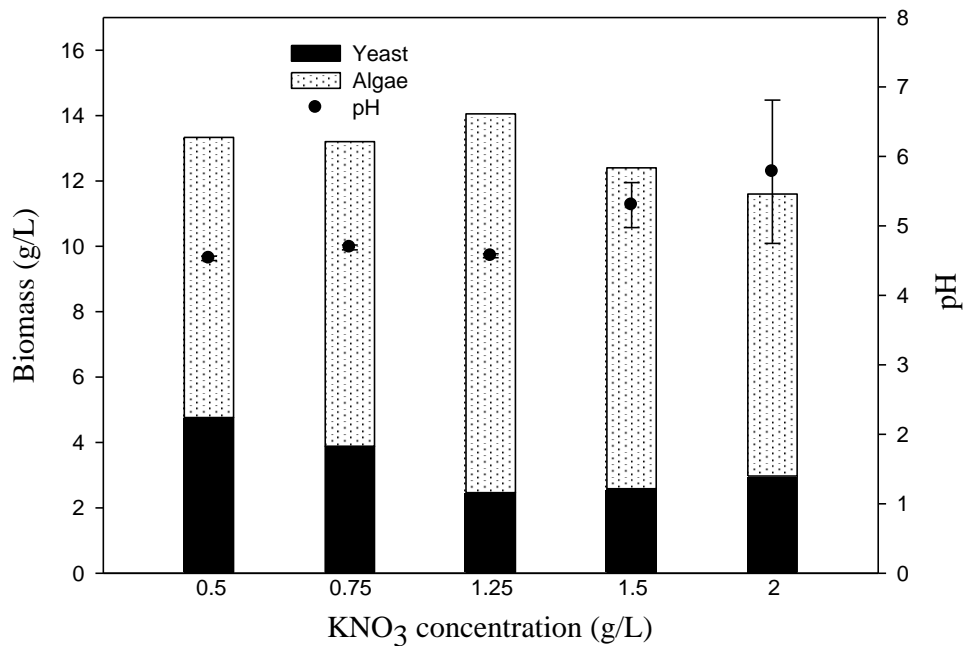


圖 4-6 不同起始  $\text{KNO}_3$  濃度對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之生長之影響

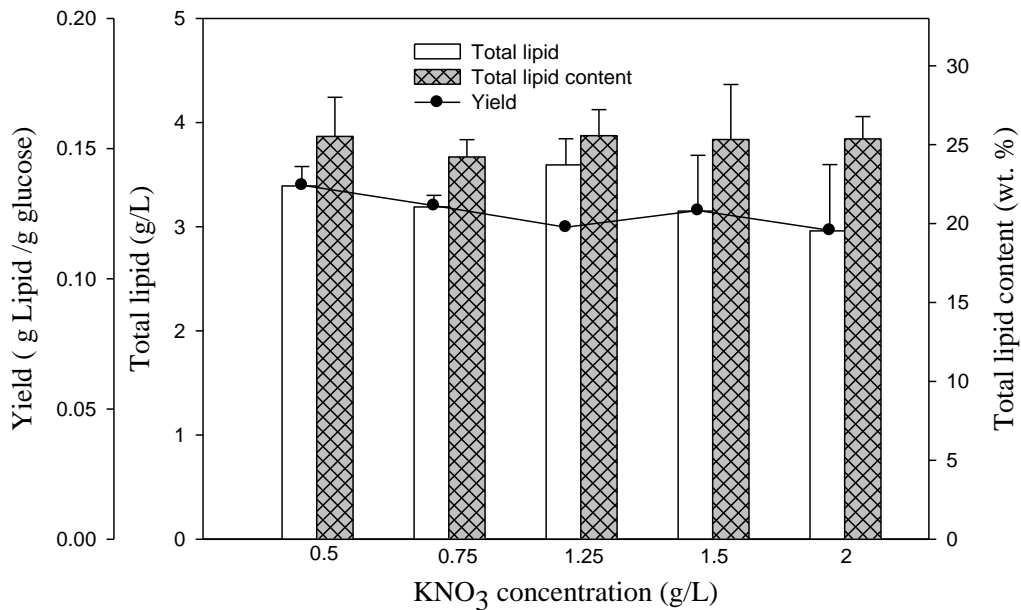


圖 4-7 不同起始 KNO<sub>3</sub> 濃度對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養油脂累積之影響

## (2) 硫酸銨 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 添加之影響

從表 4-5 得知，不論 KNO<sub>3</sub> 濃度為 0.5 g/L 或 1.25 g/L，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的添加皆會促進 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 的生長。當 KNO<sub>3</sub> 為 0.5 g/L 時，添加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 時，*R. glutinis* 菌數增加為 1.27 倍，*S. obliquus* 增加為 2.73 倍。當 KNO<sub>3</sub> 為 1.25 g/L 時，添加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 時，*R. glutinis* 菌數增加為 1.22 倍，*S. obliquus* 增加為 1.60 倍。從圖 4-8、4-9 中發現，添加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 雖然會促進 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 的生長，但卻不利於油脂的累積，油脂累積量自 3.392 ~ 3.594 g/L 下降至 2.523 ~ 2.675 g/L，下降了約 26 %。油脂含量亦從 25.5 % 降至約為 19.2 %，從單位葡萄糖轉換成油脂的產率中明顯得知 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的添加會降低油脂的轉換率，其推測是由於培養基的營養物質大都用於細胞的生長，故油脂的累積量相對地減少。

表 4-5 添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  下之 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 的菌數值

$\text{KNO}_3 / (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = 5 (g/ g)	Cell count after 96 hr. (cells/mL)		ratio ( yeast / algae)
	Yeast	Microalga	
0.5 / 0	$7.84 \times 10^8$	$1.83 \times 10^7$	43
0.5 / 0.1	$9.95 \times 10^8$	$5.00 \times 10^7$	19
1.25 / 0	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17
1.25 / 0.25	$6.77 \times 10^8$	$5.33 \times 10^7$	14

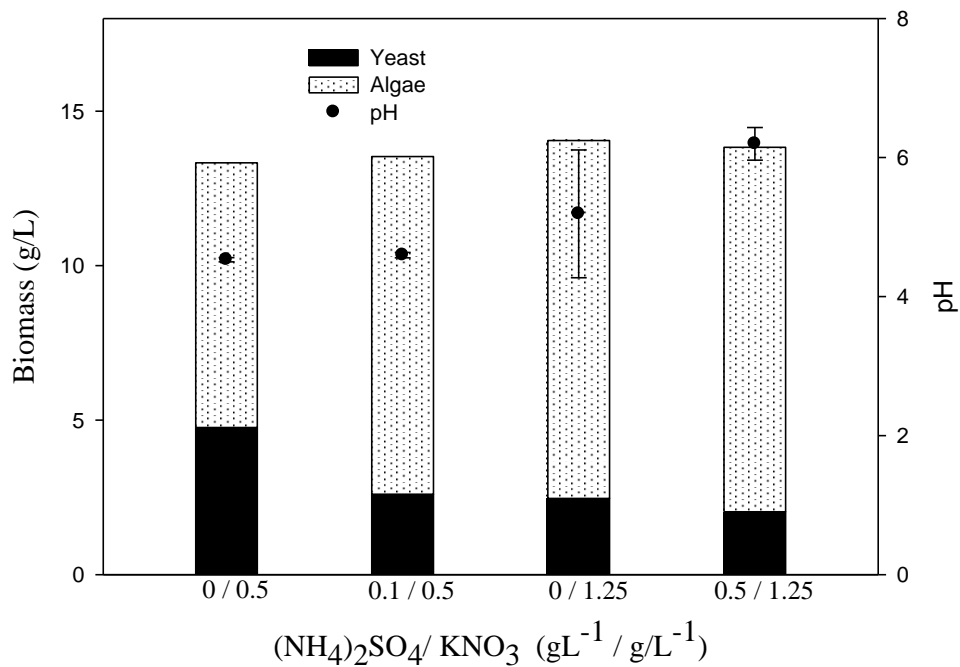


圖 4-8  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的添加對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之生長之影響

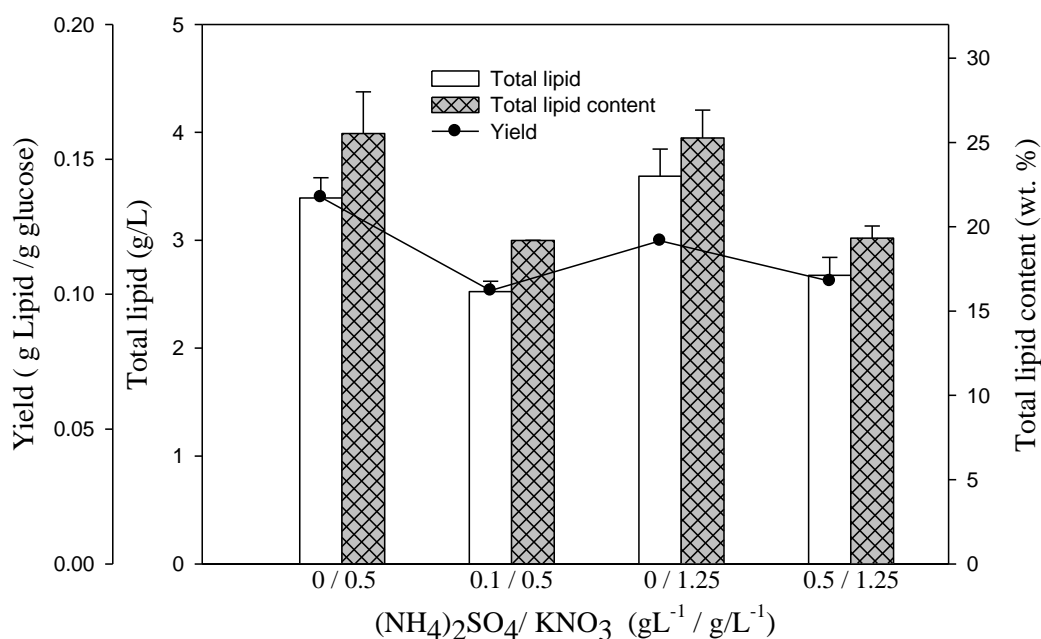


圖 4-9 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的添加對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之油脂累積的影響

### (3) 有機氮源之影響

從表 4-6 得知，當氮源充足時，即 1.25 g/L KNO<sub>3</sub>，YE 的添加使 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 菌數略為提高；當氮源有限時，即 0.5 g/L KNO<sub>3</sub>，YE 的添加會促進 *R. glutinis* 的生長；*S. obliquus* 菌數略為下降，其推測可能是較高的菌數量產生的光遮蔽效應，與相對較低的 KNO<sub>3</sub> 濃度所造成的。從 4.1.3 氮源濃度之影響實驗中可以得知，*S. obliquus* 對無機氮源的選擇性較高；而 *R. glutinis* 對有機氮源的選擇性較高。

而圖 4-10、4-11 顯示，培養基中含有 YE 時有較高的生物質量與油脂累積。在 0.5 g/L KNO<sub>3</sub> 且 YE 存在下，*S. obliquus* 與 *R. glutinis* 有最接近的生物質量，分別為 6.316、7.018 g/L。當培養基的氮源含量過低時，不利 *S. obliquus* 與 *R.*

*glutinis* 生長，使葡萄糖無法完全被代謝，形成碳源過剩而氮源限制的培養條件，使單位葡萄糖轉換成油脂的產率與油脂含量較高，分別為  $0.146 \text{ gg}^{-1}$ 、 $34.90 \pm 3.58\%$ 。

表 4-6 YE(Yeast extract)添加與否對 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 共培養菌數之影響

YE added or not	Cell count after 96 hr. (cells/mL)		Ratio ( yeast / algae)
	Yeast	Microalga	
0.5 g/L KNO <sub>3</sub>			
YE	$8.41 \times 10^8$	$9.17 \times 10^6$	92
No YE	$4.68 \times 10^8$	$1.25 \times 10^7$	37
1.25 g/L KNO <sub>3</sub>			
YE	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17
No YE	$5.59 \times 10^8$	$2.25 \times 10^7$	25

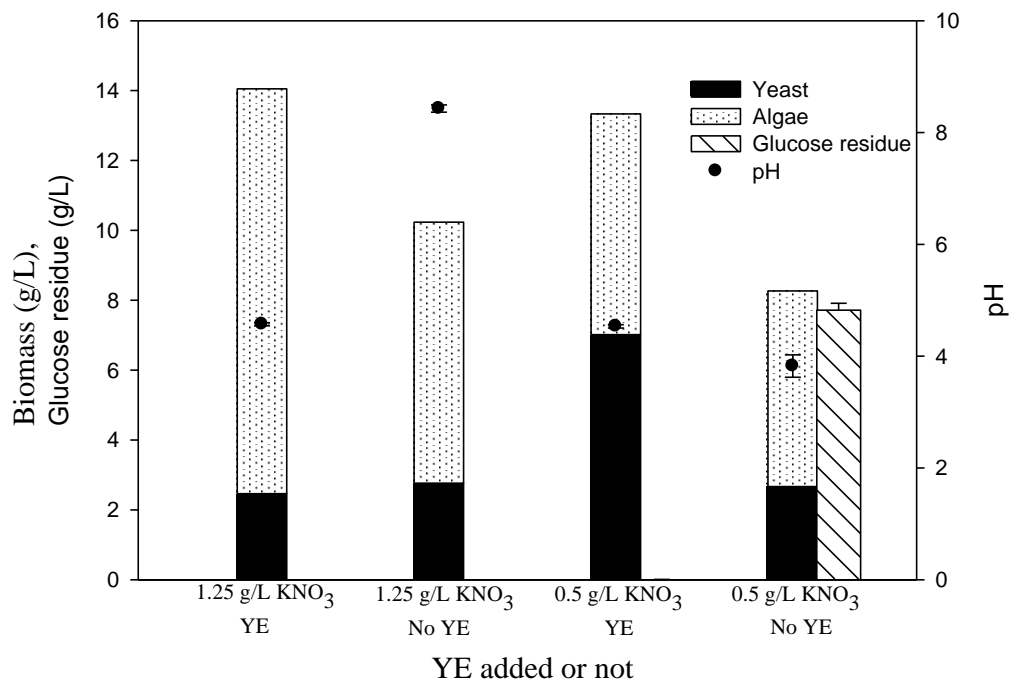


圖 4-10 YE 的添加對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之生長的影響

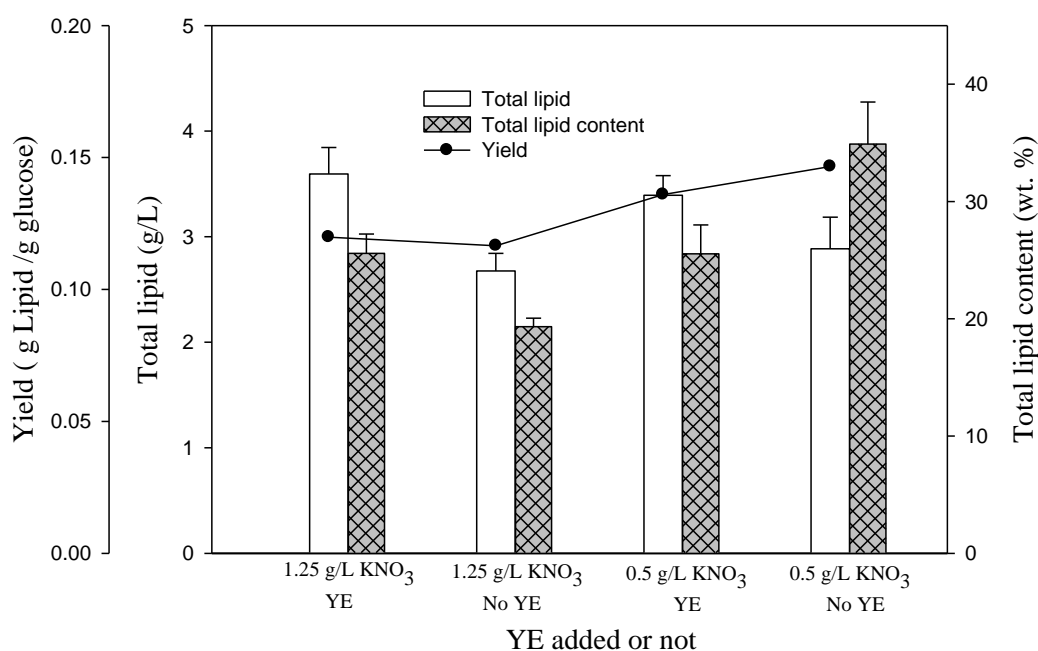


圖 4-11 YE 的添加對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之油脂累積的影響

#### 4.1.4. 碳源濃度之影響

表 4-7 顯示出隨著葡萄糖濃度的增加，*S. obliquus* 的菌數亦提高。Kim et al., 2007 亦證實當微藻在碳源過剩且氮、磷限制條件下生長，發酵液的 pH 值會因此下降而影響微藻的生長速率與光合作用，然而會提高微藻的生長。當葡萄糖濃度為 35 g/L 時，*S. obliquus* 與 *R. glutinis* 有最大的菌數值，分別為  $3.21 \times 10^7$ 、 $8.27 \times 10^8$ ；此時 *R. glutinis* 菌數略高於其他的濃度，其推測是由於 *S. obliquus* 於 35 g/L 時有較好的生長，使得 *R. glutinis* 有較充足的 O<sub>2</sub> 供應，且抑制 *R. glutinis* 生長的有機酸被 *S. obliquus* 代謝，pH 亦有較好的調控。然而，當葡萄糖濃度大於 30 g/L 時，*S. obliquus* 的生長開始受到抑制，使 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 的菌數比例開始提高；而葡萄糖濃度的增加，對 *R. glutinis* 的生長並沒有明顯的影響。

圖 4-12、4-13 顯示葡萄糖濃度的增加有助於油脂的累積與含量的提高，此與 Papanikolaou, 2004 有相同的結論。在 50 g/L 葡萄糖濃度時，有最大的生物質量  $15.13 \pm 1.041$  g/L、油脂累積  $5.95 \pm 0.392$  g/L、油脂含量  $39.34 \pm 1.05$  %。雖然 100 g/L 葡萄糖濃度時有最大單位葡萄糖轉換成油脂的產率， $0.323$  gg<sup>-1</sup>，但隨著 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 菌數的減少，生物質量、油脂累積與油脂含量開始降低。

表 4-7 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 於不同起始葡萄糖濃度之菌數值

Glucose (g/L)	Cell count after 96 hr. (cells/mL)		Ratio (yeast / algae)
	Yeast	Microalga	
25	$7.84 \times 10^8$	$1.83 \times 10^7$	43
35	$8.27 \times 10^8$	$3.21 \times 10^7$	26
50	$7.44 \times 10^8$	$2.13 \times 10^7$	35
100	$7.00 \times 10^8$	$8.75 \times 10^6$	80

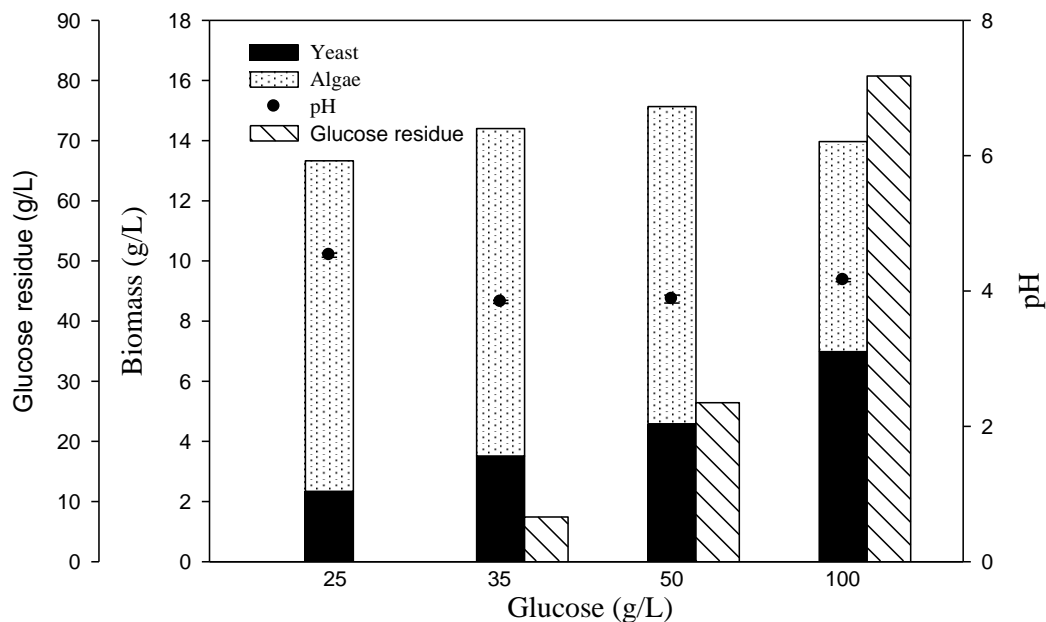


圖 4-12 不同起始葡萄糖濃度對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之生長的影響

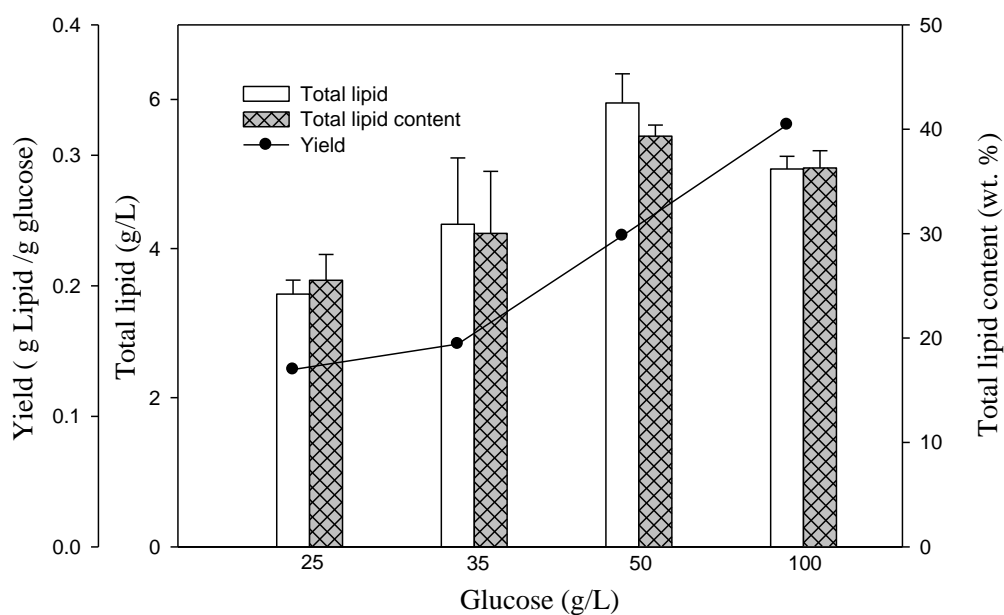


圖 4-13 不同起始葡萄糖濃度對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養油脂累積之影響

#### 4.1.5. 鹽度(NaCl)添加之影響

##### (1) 鹽度濃度之影響

從表 4-8、圖 4-14、4-15 中得知，NaCl 的添加可以促進 *S. obliquus* 的生長，當鹽度提高至 0.2 g/L 時，有最高的菌數值  $2.88 \times 10^7$ ，為 0 g/L NaCl 的 2.3 倍，但油脂的累積卻受到抑制。NaCl 的添加不利於生物乾重的提高，卻能增加油脂的累積與油脂含量，較高為 0.05 g/L NaCl 的  $3.272 \pm 0.120$  g/L、 $40.64 \pm 2.92$  %，與 0.1 g/L NaCl 的  $3.129 \pm 0.149$  g/L、 $41.02 \pm 1.62$  %，油脂累積量提升了 8.5~13.4 %；推測是由於菌體生產的能量大都消耗在合成與累積油脂而非蛋白質，使菌體生長受阻(Mohammed, 1992)。Kim et al., 1996 亦指出當細胞在具有一定壓力下培養時，其油脂的累積量會高於菌體在最喜歡的條件下培養。當 NaCl 濃度為 0.05 g/L 時，



有最高的單位葡萄糖轉換成油脂的產率， $0.207 \text{ gg}^{-1}$ 。

從圖 4-16 中得知 NaCl 的添加有助於葉黃素(Lutein)的生成，在  $0.05 \text{ g/L NaCl}$  時有最大產率  $0.251 \text{ mg/g}$ ，但  $\beta$ -胡蘿蔔素( $\beta$ -carotene)卻不隨 NaCl 的添加有顯著的變化。

表 4-8 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 於不同起始 NaCl 濃度之菌數值

NaCl (g/L)	Cell count after 96 hr. (cells/mL)		Ratio ( yeast / algae)
	Yeast	Microalga	
0	$4.68 \times 10^8$	$1.25 \times 10^7$	37
0.05	$4.55 \times 10^8$	$1.50 \times 10^7$	30
0.1	$3.61 \times 10^8$	$1.50 \times 10^7$	24
0.2	$5.34 \times 10^8$	$2.88 \times 10^7$	19

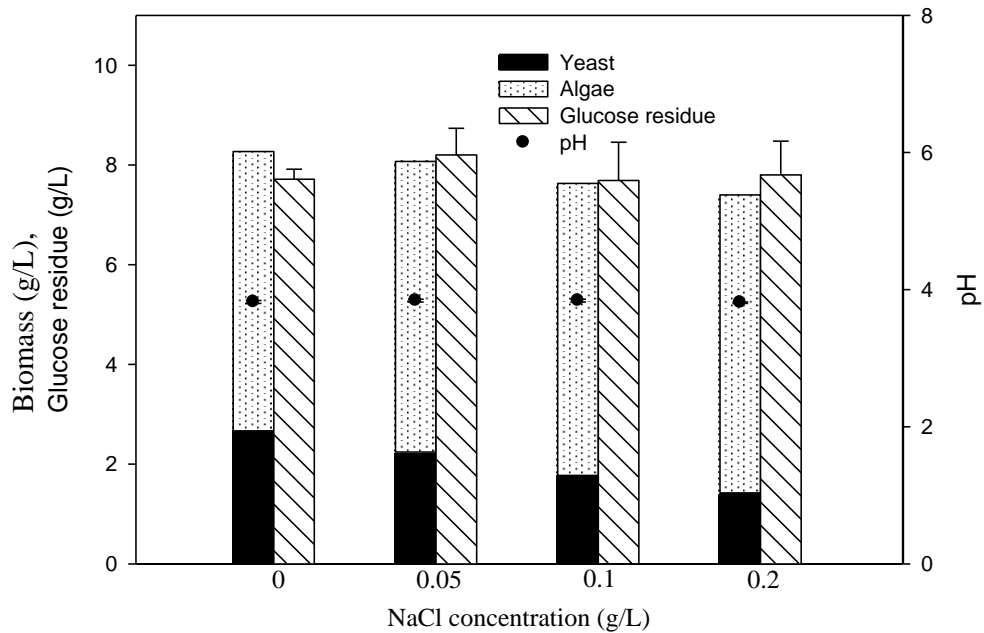


圖 4-14 不同起始鹽度對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之生長的影响

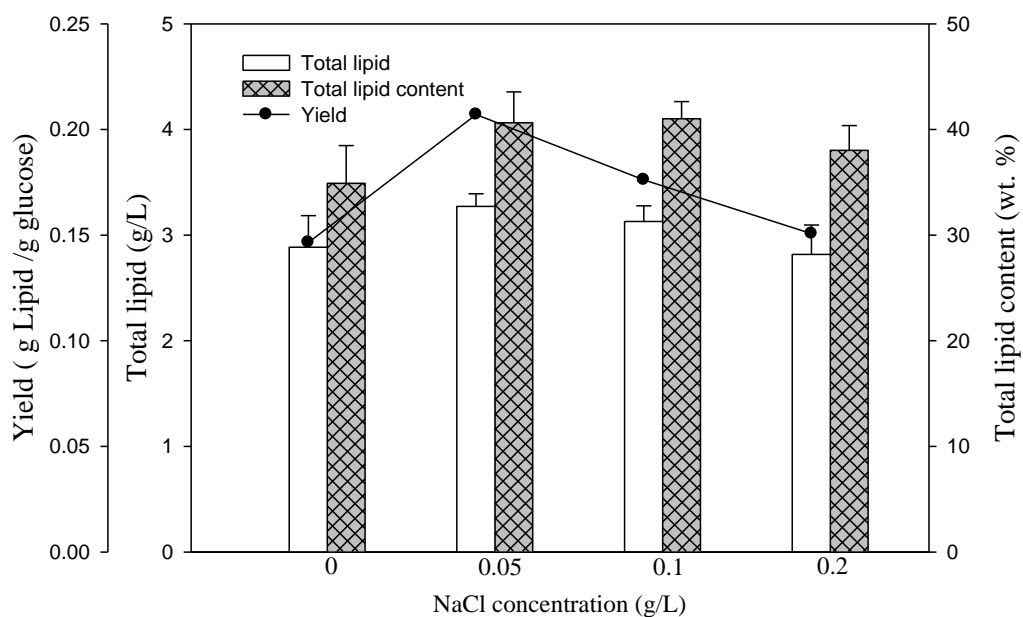


圖 4-15 不同起始鹽度對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之油脂累積的影響

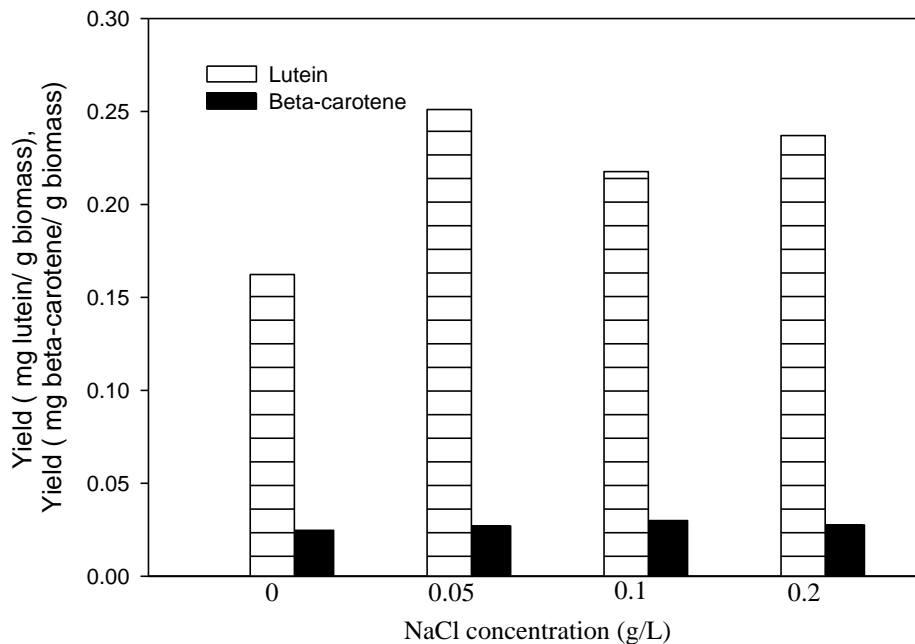


圖 4-16 不同起始鹽度對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 葉黃素與  $\beta$ -胡蘿蔔素累積的影響

## (2) 鹽度添加時間之影響

表 4-9 顯示出 NaCl 的添加時間對 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 的菌數影響並不顯著。隨著 NaCl 添加時間的延遲，生物質量有提高的趨勢，在 48 小時達  $9.57 \pm 0.351$  g/L，提高 18.6 %；但油脂累積量從  $3.272 \pm 0.120$  g/L 降至  $2.960 \pm 0.848$  g/L，下降了 9.5 %。油脂含量從  $40.64 \pm 2.92$  % 降至  $30.92 \pm 1.74$  %，如圖 4-17、4-18，NaCl 的添加時間對單位葡萄糖轉換成油脂的產率有顯著的影響，在 0 小時時添加有最高的產率， $0.207 \text{ gg}^{-1}$ 。

從圖 4-19 中得知，NaCl 添加時間的延遲雖不利於葉黃素的生成，卻使  $\beta$ -胡蘿蔔素含量提高，從 0.0271 mg/g 提高至 0.145–0.160 mg/g，增加 4.35–4.90 倍。

表 4-9 0.05 g/L NaCl 添加時間對 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 共培養菌數之影響

Adding time (hr.)	Cell count after 96 hr. (cells/mL)		Ratio ( yeast / algae)
	Yeast	Microalga	
0	$4.68 \times 10^8$	$1.25 \times 10^7$	37
24	$5.34 \times 10^8$	$1.42 \times 10^7$	38
48	$5.06 \times 10^8$	$1.17 \times 10^7$	43
72	$5.90 \times 10^8$	$1.75 \times 10^7$	34

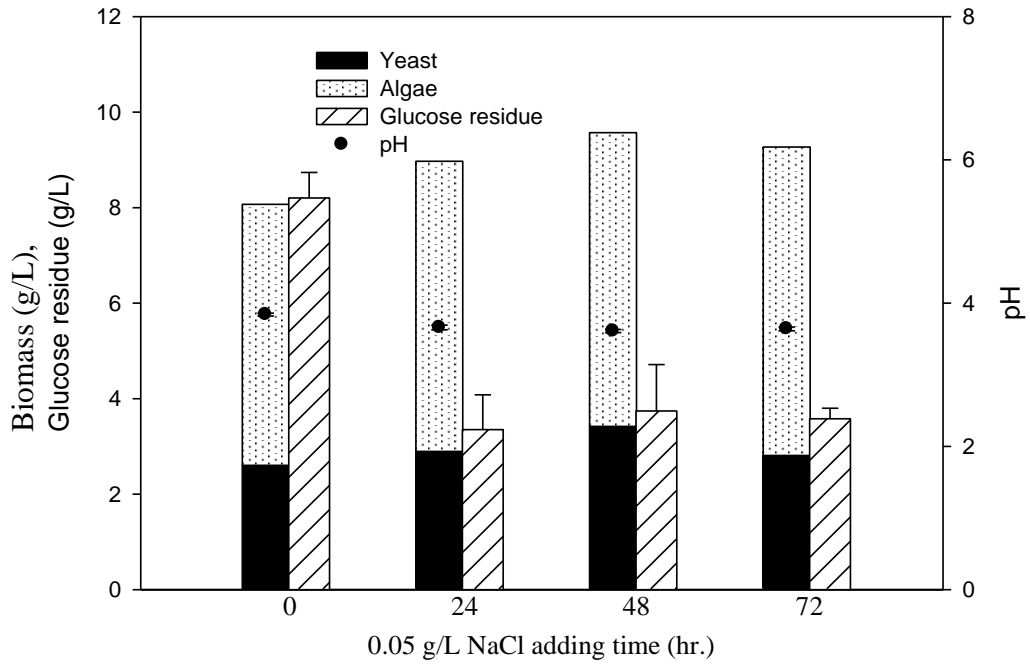


圖 4-17 0.5 g/L NaCl 添加時間對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養生長之影響

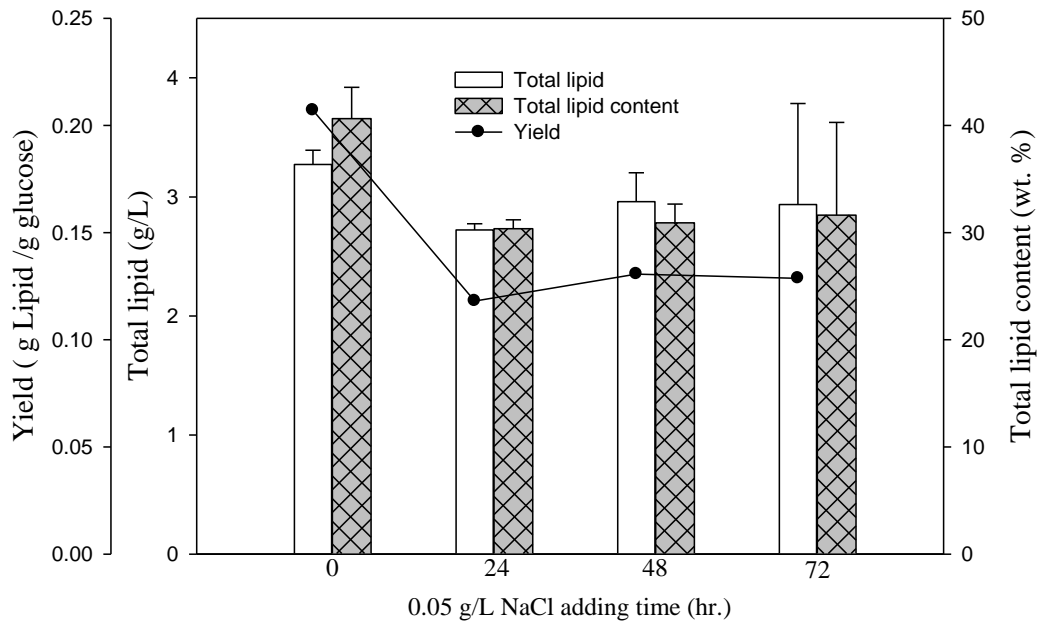


圖 4-18 0.5 g/L NaCl 添加時間對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養油脂累積之影響

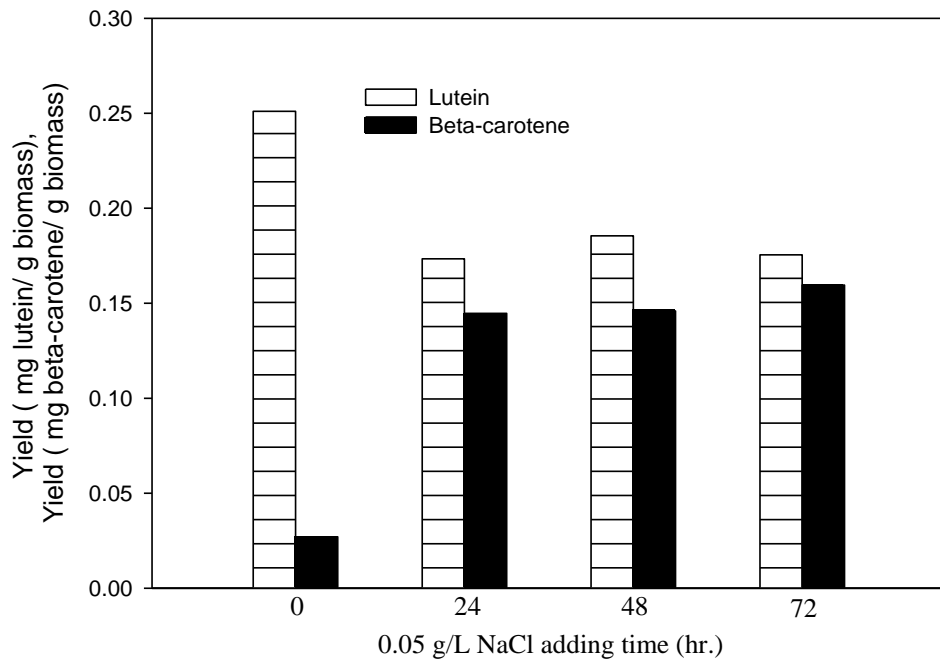


圖 4-19 0.5 g/L NaCl 添加時間對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之葉黃素與  $\beta$ -胡蘿蔔素累積的影響

#### 4.1.6. 起始 pH 值之影響

*S. obliquus* 的菌數隨著起始 pH 的增加而略降，造成生物質量的降低，如表 4-10、圖 4-20。推測是因為 *S. obliquus* 最適合的 pH 值為 6.0-6.2，光合作用的過程會代謝  $\text{CO}_2$  產生  $\text{OH}^-$ ，使培養基之 pH 值上升，故起始 pH 的增加並不利於 *S. obliquus* 的生長。而 *R. glutinis* 最適合的 pH 值為 5.5，*R. glutinis* 在代謝葡萄糖的過程中會產生有機酸，使 pH 值下降，透過 *S. obliquus* 代謝產生的  $\text{OH}^-$  能使培養基的 pH 值得到較佳的緩衝，較長時間維持於適合 *R. glutinis* 生長的 pH 值。

在 pH 值為 7 時，較適合 *R. glutinis* 的培養時間增加，使 *R. glutinis* 菌數提高，因而略微提高油脂的累積與含量，分別為  $3.544 \pm 0.131 \text{ g/L}$ 、 $29.91 \pm 1.89 \%$ ，其單位葡萄糖轉換成油脂的產率為  $0.166 \text{ gg}^{-1}$ 。

但當 pH 值為 8 時，*S. obliquus* 與 *R. glutinis* 菌數變化雖不大，累積的油脂卻從 pH 值為 7 的  $3.544 \pm 0.131$  g/L 降至  $2.869 \pm 0.869$  g/L，顯示較高的 pH 值並不利於 *R. glutinis* 油脂的累積，造成較低的油脂含量與產率。

表 4-10 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 於不同起始 pH 之菌數值

Initial pH	Cell count after 96 hr. (cells/mL)		ratio ( yeast / algae)
	Yeast	Microalga	
6	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17
7	$6.85 \times 10^8$	$1.54 \times 10^7$	44
8	$6.20 \times 10^8$	$1.71 \times 10^7$	36

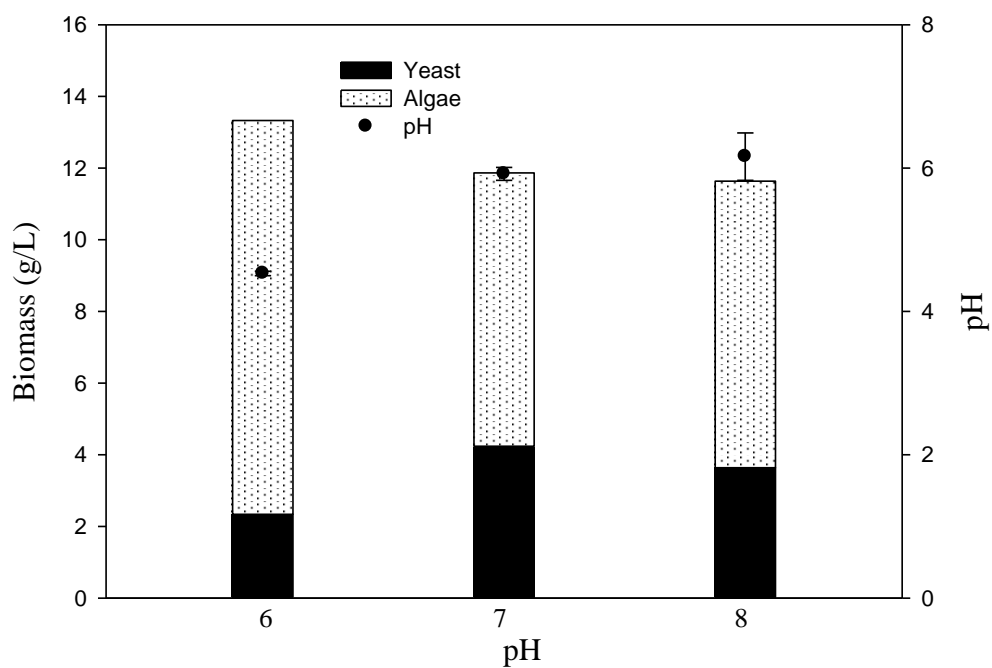


圖 4-20 不同起始 pH 對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之生長的影响

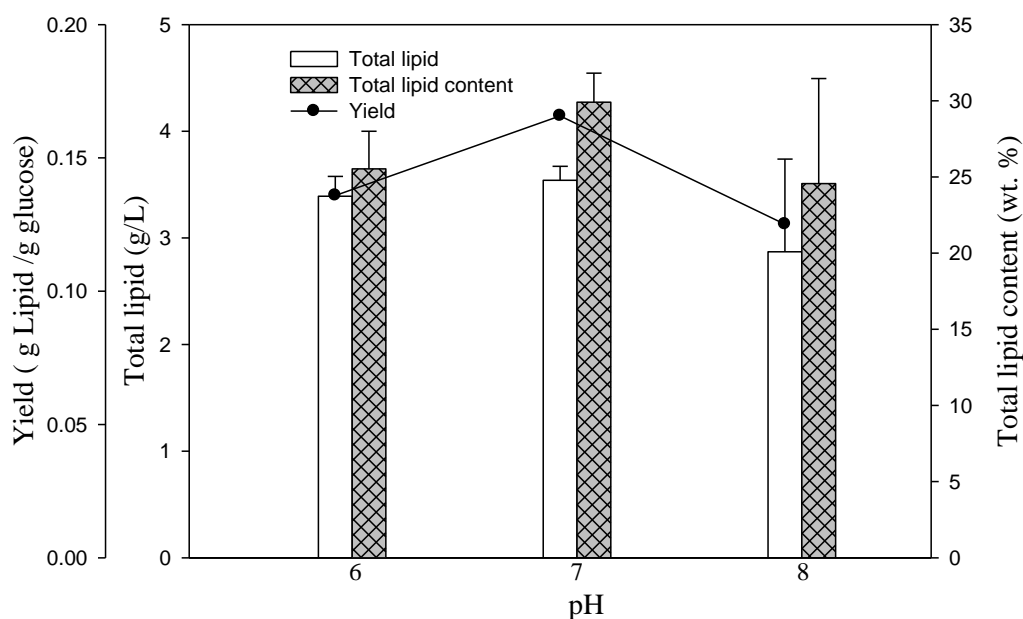


圖 4-21 不同起始 pH 對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之油脂累積的影響

#### 4.1.7. 檔板之影響

藉檔板(Baffle)增加溶氧量使 *R. glutinis* 菌數自  $5.56 \times 10^8$  增加至  $7.56 \times 10^8$ ，提高了 36%，過高的菌數值可能造成遮蔽效應，或 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 競爭碳氮源，使 *S. obliquus* 菌數略減。培養 96 小時後 pH 值為 8.3，根據 4.1.6 起始 pH 之影響的實驗結果顯示，pH 值高於 8 時並不利於 *R. glutinis* 油脂的累積，故添加檔板雖然可以使 *R. glutinis* 菌數增加，但油脂含量與產率卻沒有因此增加。

表 4-11 檔板(Baffle)對 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 菌數值之影響

Baffle or not	Cell count after 96 hr. (cells/mL)		Ratio ( yeast / algae)
	Yeast	Microalga	
Without	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17
With	$7.56 \times 10^8$	$1.67 \times 10^7$	45

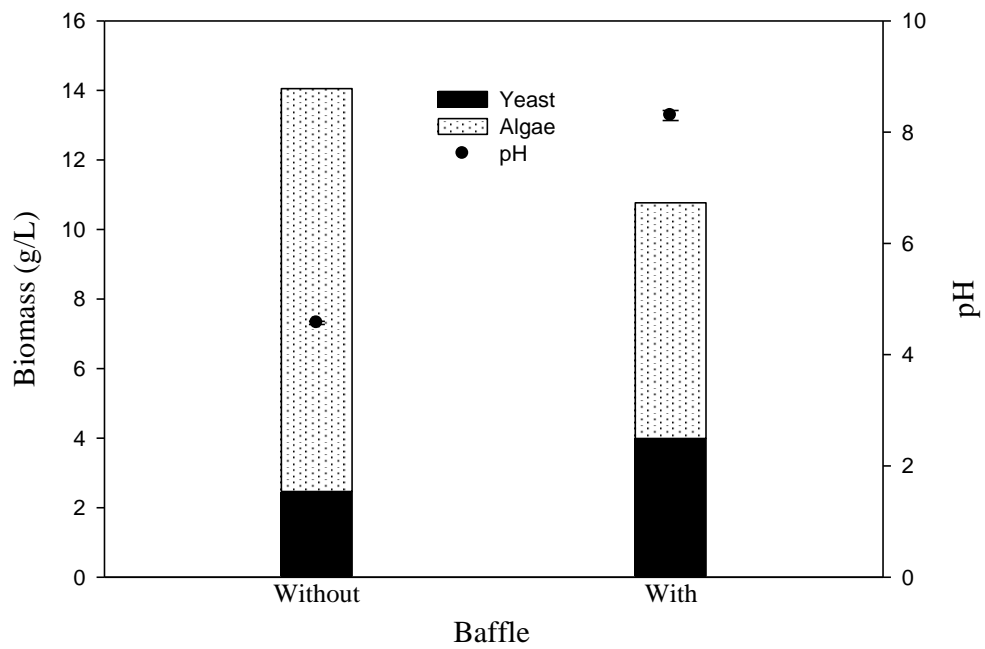


圖 4-22 檔板(Baffle)對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之生長的影响

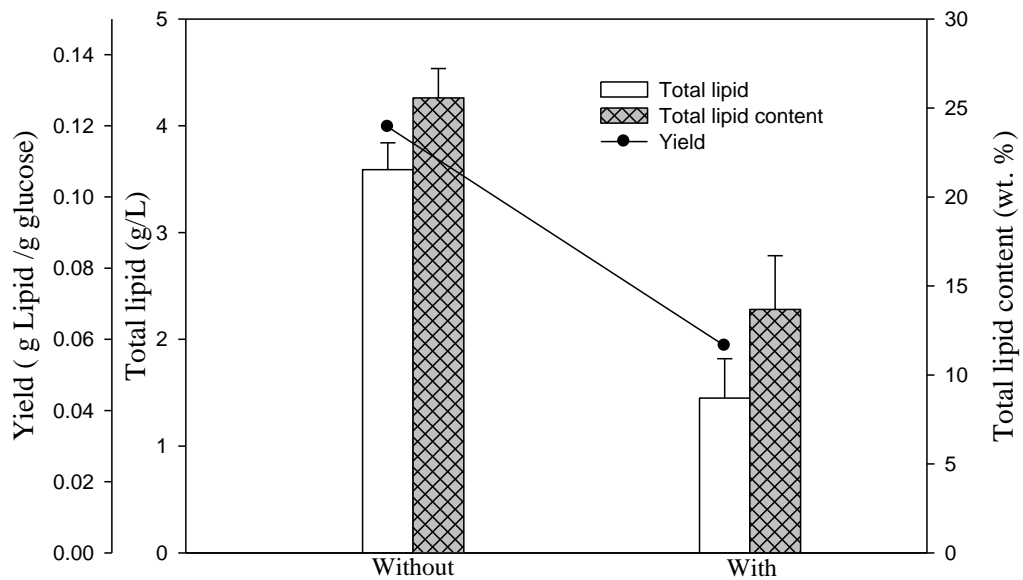


圖 4-23 檔板(Baffle)對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之油脂累積的影响



#### 4.1.8. 溫度之影響

當溫度低於或高於 24°C 時，並不利於 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 的生長，雖然 22°C 時有最高的 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 菌數值，分別為  $1.04 \times 10^9$ 、 $1.00 \times 10^8$ 。較低的生物質量顯示菌數的提高或油脂含量的增加是生物在較差的生長環境下之防衛機制，因而從 24°C 的  $25.57 \pm 1.65\%$  提高至 22°C 的  $36.77 \pm 12.87\%$ ，與 26°C 的  $32.94 \pm 1.97\%$ ，圖 4-25 亦顯示出 22、26°C 下有較高的單位葡萄糖轉換成油脂的產率，分別為  $0.148$ 、 $0.146 \text{ gg}^{-1}$ 。

表 4-12 不同培養溫度對 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 共培養的菌數值之影響

Temperature (°C)	Cell count after 96 hr. (cells/mL)		
	Yeast	Microalga	ratio ( yeast / algae)
22	$1.04 \times 10^9$	$1.00 \times 10^8$	10
24	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17
26	$4.95 \times 10^8$	$3.27 \times 10^7$	15

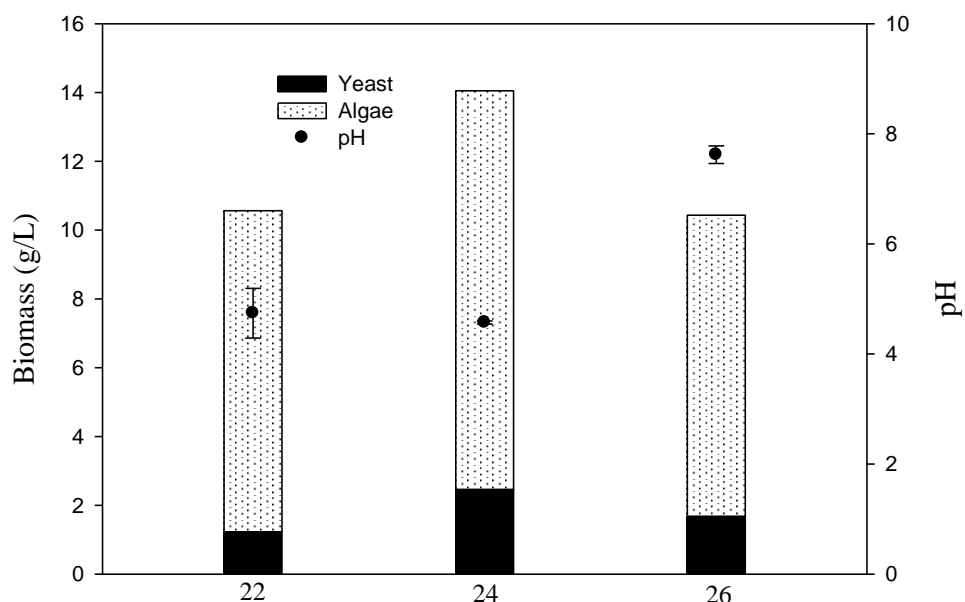


圖 4-24 不同培養溫度對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之生長的影響

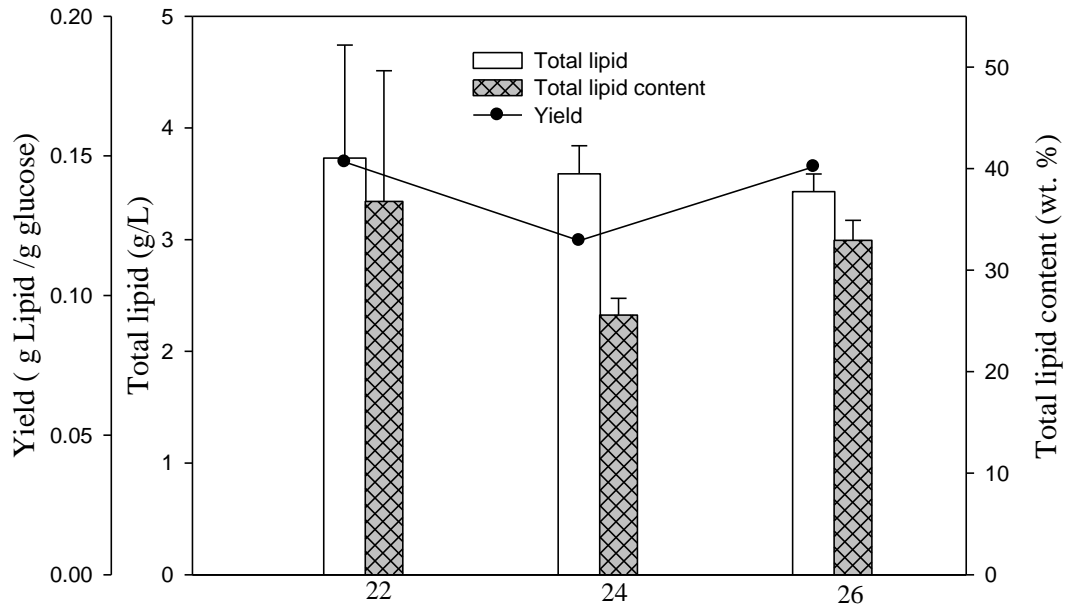


圖 4-25 不同培養溫度對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之油脂累積的影響

#### 4.1.9. 光照之影響

從圖 4-26 顯示，光照條件下，總生物質量為  $14.05 \pm 0.07$  g/L，油脂累積量為  $3.594 \pm 0.251$  g/L，油脂含量為  $25.57 \pm 1.65$  %；不照光的條件下，總生物質量為  $6.67 \pm 0.15$  g/L，油脂累積量為  $1.440 \pm 0.330$  g/L，油脂含量為  $21.31 \pm 4.66$  %，顯示出在光照的條件下，顯示出 *S. obliquus* 會進行光合作用，釋出氧氣供 *R. glutinis* 生長使用，使 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 間有較佳的共培養，使得生物質量、油脂累積量與含量皆較不照光條件佳。

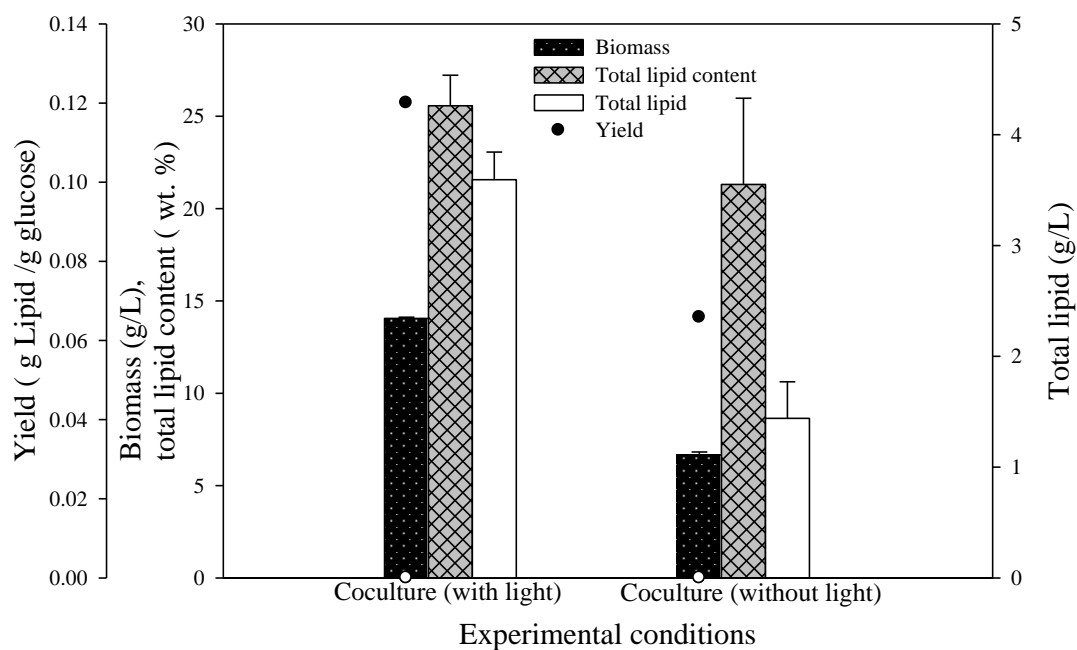


圖 4-26 光照對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之影響

#### 4.1.10. 光強度之影響

隨著光強度的增加，*S. obliquus* 與 *R. glutinis* 的菌數亦提高。然而，*R. glutinis* 相較於 *S. obliquus* 有較快的生長速率；且 *R. glutinis* 菌數的增加，可能使光遮蔽效應變大，或營養物質的競爭，導致 *S. obliquus* 菌數自  $2.08 \times 10^7$  下降至  $1.25 \times 10^7$ 。而從圖 4-28 發現，隨著光強度的增加，累積的油脂與油脂含量降低。當光強度增加時，*R. glutinis* 在共培養中佔的比例愈高，而文獻中指出 *R. glutinis* 在照光的條件下能有較高的菌數、較低的油脂含量；反之，*R. glutinis* 不照光的條件下有較低的菌數、較高的油脂含量(張, 2011)。

表 4-13 不同培養光強度對 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 共培養的菌數值之影響

Light intensity ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	Cell count after 96 hr. (cells/mL)		Ratio ( yeast / algae)
	Yeast	Microalga	
47	$4.68 \times 10^8$	$1.25 \times 10^7$	37
86	$7.03 \times 10^8$	$2.08 \times 10^7$	34
115	$6.89 \times 10^8$	$1.25 \times 10^7$	55

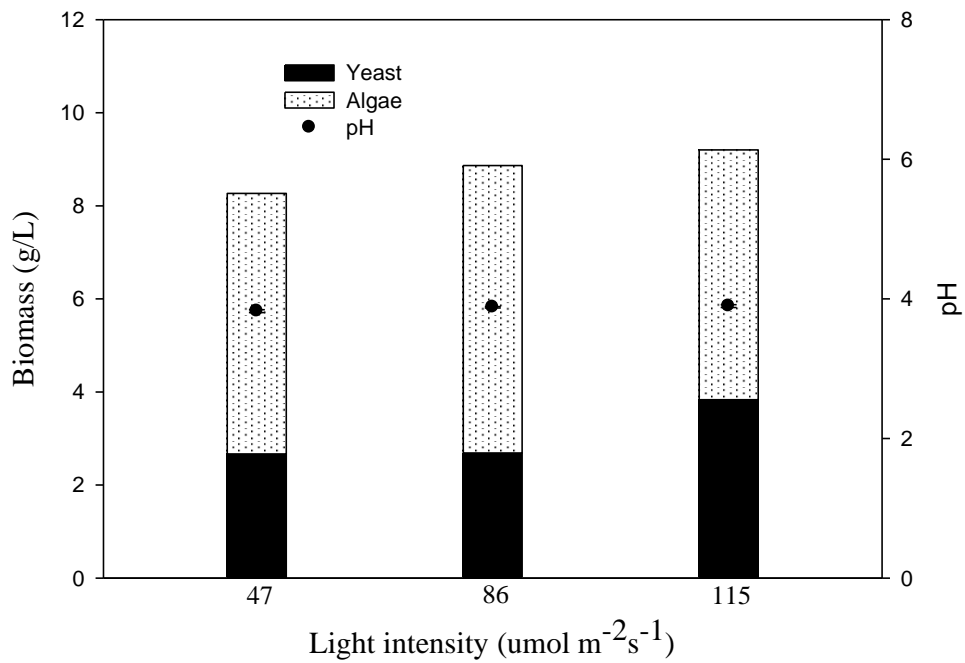


圖 4-27 不同光強度對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之生長的影響

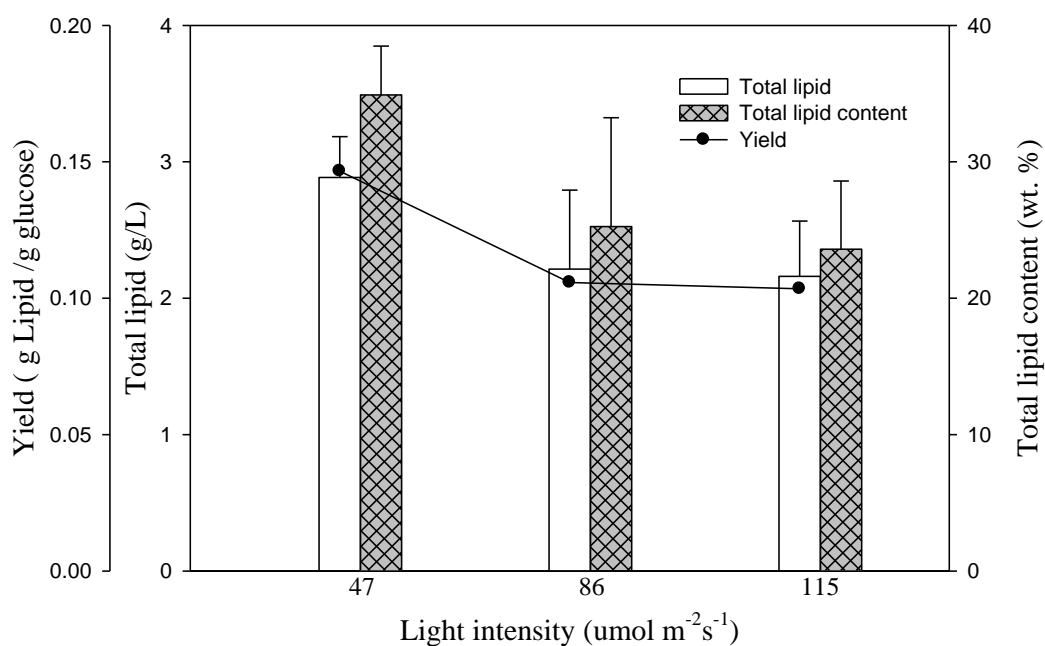


圖 4-28 不同光強度對 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之油脂累積的影響

#### 4.2. 攪拌式發酵槽批次程序

*R. glutinis* 代謝過程中所產生的 CO<sub>2</sub> 量可能低於 *S. obliquus* 代謝的需求量，故提供 2% CO<sub>2</sub> 以促進 *S. obliquus* 生長，代謝 *R. glutinis* 產生的有機酸，進而提供 *R. glutinis* 較好的培養環境，以達到 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 較佳的互利共生之環境，結果如圖 4-29、4-30、4-31。

單獨培養所得到的生物質量分別為 *S. obliquus* 的 6.6 g/L、*R. glutinis* 的 6.3 g/L，而 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 共培養為 9.7 g/L。而油脂累積量則從 *S. obliquus* 的 1.856 g/L、*R. glutinis* 的 1.742 g/L 上升至 3.664 g/L。油脂含量從 *S. obliquus* 的 29.46%、*R. glutinis* 的 26.40% 上升至 37.77%。

從表 4-14 的搖瓶與 5L 發酵槽之比較得知，雖然 CO<sub>2</sub> 的進氣並不利於 *R.*

*glutinis* 的生長，但放大培養後油脂累積量並不小於搖瓶的  $3.594 \pm 0.250$  g/L，且油脂含量也遠高於搖瓶的  $25.57 \pm 1.65$  %，提高了 12.2 %，顯示出適量的 CO<sub>2</sub> 進氣可以提高油脂含量，與 *S. obliquu* 和 *R. glutinis* 共培養放大的可行性。

表 4-14 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 共培養之搖瓶與 5L 發酵槽之比較

	Flask		Fermenter	
	Total lipid (g/L)	Total lipid content (%)	Total lipid (g/L)	Total lipid content (%)
<b>Coculture</b>	3.594	25.57	3.664	37.77
<b>Yeast</b>	1.777	16.00	1.856	29.46
<b>Algae</b>	0.370	18.71	1.742	26.40

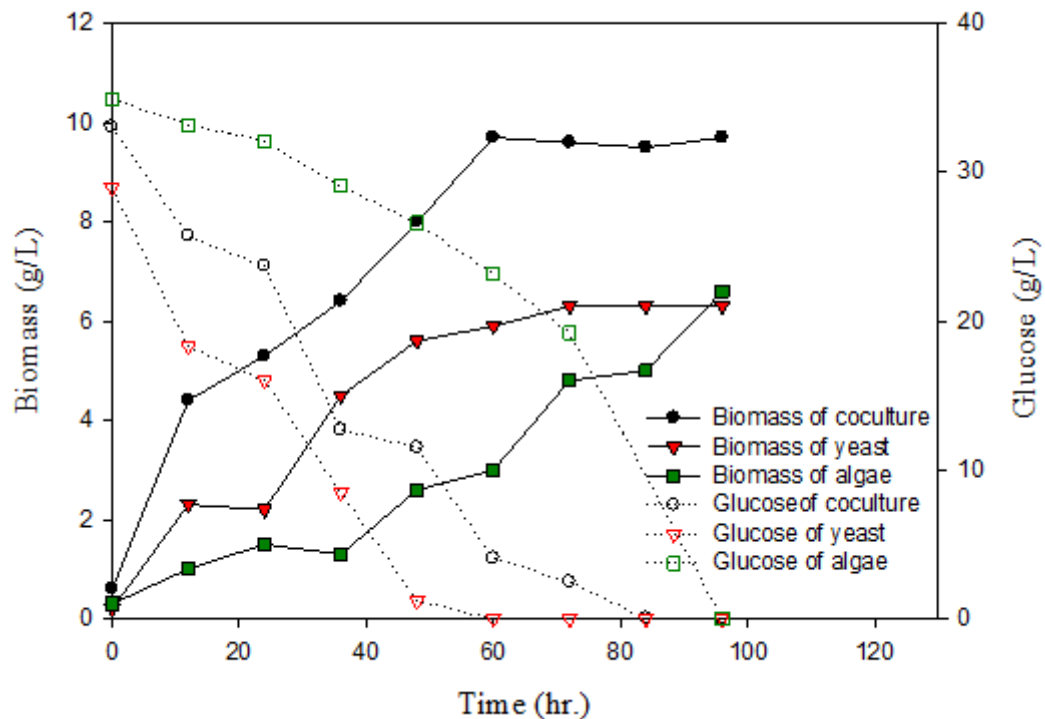


圖 4-29 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 於 5L 發酵槽中單獨培養(Pure culture)與共培養(Coculture)的生物質量與葡萄糖之變化

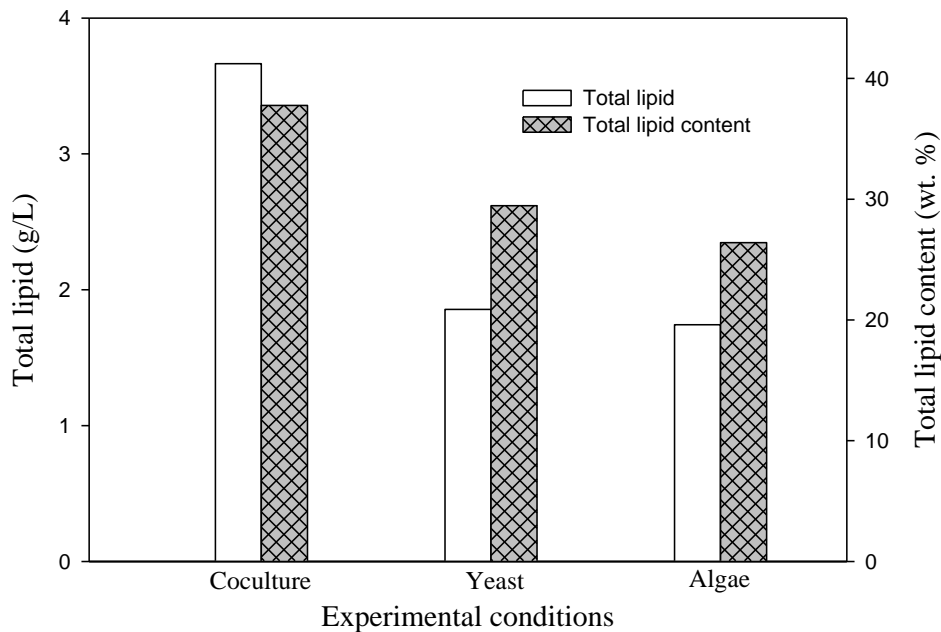


圖 4-30 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 於 5L 發酵槽中單獨培養(Pure culture)與共培養(Coculture)的油脂累積與油脂含量

#### 4.3. 6 L 氣舉式發酵反應器 (Air-lift bioreactor)

實驗結果發現不論是 1.25 g/L  $\text{KNO}_3$  & YE 或 0.5 g/L  $\text{KNO}_3$  & No YE 的培養條件，在 0 - 48 小時都有一樣的生長趨勢；而 48 小時後 1.25 g/L  $\text{KNO}_3$  & No YE 的培養條件得到略高於 0.5 g/L  $\text{KNO}_3$  & No YE 的生物質量。1.25 g/L  $\text{KNO}_3$  & YE 有較快的葡萄糖效率，從實驗 4.1.3 氮源濃度之影響得知 1.25 g/L  $\text{KNO}_3$  & No YE 所得的菌數細胞高於 0.5 g/L  $\text{KNO}_3$  & No YE，菌體細胞有較適合的生長環境，使得葡萄糖有較快的消耗效率，因而得到略高的生物質量，7.1 g/L，如圖 4-31，但該實驗顯示 6 L 氣舉式發酵反應器的光遮蔽效應影響大於培養基中碳氮源的濃度。

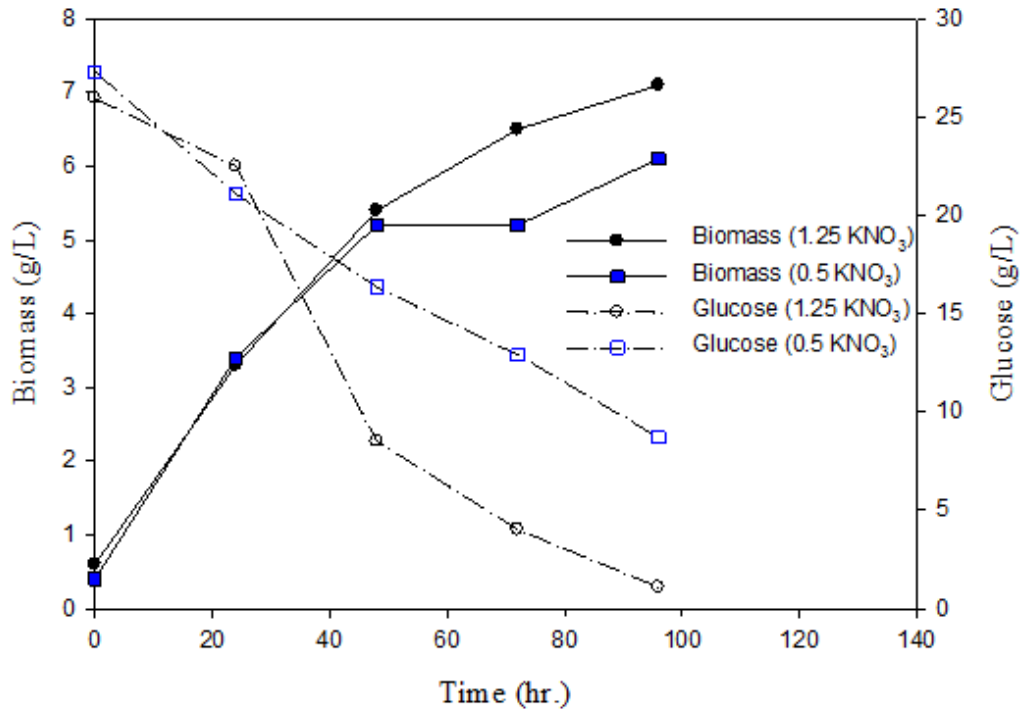


圖 4-31 6L 氣舉式發酵反應器，*R. glutinis* 與 *S. obliquus* 於不同培養條件下的生物質量與葡萄糖之變化

#### 4.4. 發酵策略之比較

從表 4-15 得知該實驗的共培養有較佳的生物質量、油脂累積量與油脂含量，顯示出 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 在該條件下，菌體有良好的生長。

Cheirsilp et al. 2011 中共培養 *R. glutinis* 與 *C. vulgaris* 的碳源為 1% 的糖蜜，溶於培養基的糖蜜會使培養基顏色變得難以透光，使 *Chlorella vulgaris* 的光合作用受到影響，因而使 *R. glutinis* 菌體生長受到影響，且文獻亦指出，光照可以促進 *R. glutinis* 菌體的生長(張,2011)。Xue et al 2010 中共培養 *S. platensis* 與 *R. glutinis*，*S. platensis* 的生長速度較為緩慢，可能無法適當地供應 *R. glutinis*  $\text{O}_2$ ，使共培養的生物質量略低，但仍優於 *S. platensis* 與 *R. glutinis* 單獨培養的條件



下。

蔡介中 2011 共培養 *Chlorella sp.* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 之混營培養基為 *Chlorella sp.* 的培養基再額外添加 Yeast extract  $0.3 \text{ gL}^{-1}$ 、Malt extract  $0.3 \text{ gL}^{-1}$ 、Peptone  $0.5 \text{ gL}^{-1}$ ，可能是碳源不足，使得共培養的生物質量略低。Cai et al. 2007 共培養 *Amyrosiozyma cicatricosa* 與 *Isochrysis galbana*，混營培養的碳源濃度為  $2 \text{ g/L}$  葡萄糖，從實驗結果可以得知 *A. cicatricosa* 的生長速率隨著時間趨近於零，而生物質量亦沒有顯著的增加，可能是由於過碳源在培養出期就已經消耗完，使得培養後期 *A. cicatricosa* 與 *I. galbana* 無明顯的互利共生。

表 4-15 共培養文獻與本實驗研究結果之比較

Yeast / Algae	Time(day)	Biomass (g/L)	Total lipids (g/L)	g Lipid/ g Glucose	Total lipid content (%)	Reference
<i>R. glutinis</i> , <i>S. obliquus</i>	4	14.05 ± 0.07	3.594 ± 0.250	0.120	25.57 ± 1.65	This study
<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>	5	4.63 ± 0.15	2.88 ± 0.16	-	62.2	Cheirsilp et al. 2011
<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Spirulina platensis</i>	7	3.673 ± 0.018	0.467 ± 0.015	0.012	12.71 ± 0.40	Xue et al. 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Chlorella sp.</i>	2	1.884	0.358	-	19.0	蔡介中 2011
<i>Amvrosiozyma cicatricosa</i> , <i>Isochrysis galbana</i>	7	1.32 ± 0.04	0.148	0.074	11.21 ± 3.01	Cai et al. 2007

## 第五章 結論與未來展望

### 5.1. 結論

本實驗探討不同培養條件下，共培養 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 對菌體生長 (Biomass)、油脂累積 (Total lipids)、油脂含量 (Total lipid content) 等之影響，綜合以上實驗結果，列出以下幾點結論：

1. *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 在單獨培養 (Pure culture) 與共培養 (Coculture) 的實驗條件下，共培養對生物質量、油脂累積 (Total lipids) 與油脂含量皆有提升的效果，其值分別為  $14.05 \pm 0.07$  g/L、 $3.594 \pm 0.251$  g/L 與  $25.57 \pm 1.65$  %，但不利於葉黃素與  $\beta$ -胡蘿蔔素的生成。
2. 起始接菌比例對 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 共培養的影響並不顯著。
3. 不同起始  $\text{KNO}_3$  濃度實驗中， $\text{KNO}_3$  濃度的增加會促進 *S. obliquus* 的生長，但當  $\text{KNO}_3$  濃度大於 1.25 g/L 時，*S. obliquus* 的生長受到抑制，導致生物質量與油脂累積降低，但  $\text{KNO}_3$  濃度的變化對油脂含量的影響不大，皆約為 25%。
4.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的添加可以促進 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 的生長，卻不利於油脂的累積，油脂累積量下降約 26%。
5. 培養基 YE 的添加能促進 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 的生長與油脂的累積，在低氮源的條件下 (0.5 g/L  $\text{KNO}_3$ ) 影響最為顯著。但 0.5 g/L  $\text{KNO}_3$  且無 YE 的

條件下，有最高的葡萄糖轉換成油脂的產率，為  $0.146 \text{ gg}^{-1}$ ，油脂含量達  $34.90 \pm 3.58 \%$ 。

6. 從氮源濃度之影響實驗中可以得知，*S. obliquus* 對無機氮源的選擇性較高；而 *R. glutiniss* 對有機氮源的選擇性較高。
7. 從不同起始葡萄糖濃度實驗中得知，隨著葡萄糖濃度的提高，生物質量、油脂累積與油脂含量亦提高。於  $50 \text{ g/L}$  時達最大值，分別為  $15.13 \pm 1.041 \text{ g/L}$ 、 $5.95 \pm 0.392 \text{ g/L}$ 、 $39.34 \pm 1.05 \%$ 。
8.  $\text{NaCl}$  的添加可以促進 *S. obliquus* 的生長，在  $0.2 \text{ g/L}$  時，有最高的菌數值  $2.88 \times 10^7$ ，為  $0 \text{ g/L NaCl}$  的 2.3 倍。
9.  $\text{NaCl}$  的添加能促進油脂的累積，卻會降低生物質量。添加  $0.05 \text{ g/L NaCl}$  時油脂累積量達  $3.272 \pm 0.120 \text{ g/L}$ ，含量為  $40.64 \pm 2.92 \%$ ，油脂累積量提升約  $13.4 \%$ 。
10.  $\text{NaCl}$  的添加有助於葉黃素的生成，在  $0.05 \text{ g/L NaCl}$  時有最大產率  $0.251 \text{ mg/g}$ ，但  $\beta$ -胡蘿蔔素卻不隨  $\text{NaCl}$  的添加有顯著的變化。
11. 延遲添加  $\text{NaCl}$  能使生物質量提高，在 48 小時添加達  $9.57 \pm 0.351 \text{ g/L}$ ，提高  $18.6 \%$ ；但不利於油脂的累積量，累積量從  $3.272 \pm 0.120 \text{ g/L}$  降至  $2.960 \pm 0.848 \text{ g/L}$ ，下降了  $9.5 \%$ 。
12.  $\text{NaCl}$  添加時間的延遲能使  $\beta$ -胡蘿蔔素從  $0.0271 \text{ mg/g}$  提高至約  $0.145\text{--}0.160 \text{ mg/g}$ ，增加約  $435 \sim 490 \%$ ，但會降低葉黃素的生成。

13. pH 值的增加不利 *S. obliquus* 的生長；在 pH 值為 7 時 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 彼此間有較佳的 pH 調控，得到較高的油脂累積與含量分別為  $3.544 \pm 0.131$  g/L、 $29.91 \pm 1.89\%$ ，其單位葡萄糖轉換成油脂的產率亦達  $0.166 \text{ gg}^{-1}$ 。
14. 檔板會增加溶氧量，使 *R. glutinis* 菌數自  $5.56 \times 10^8$  增加至  $7.56 \times 10^8$ ，提高了 36%，但造成光遮蔽效應不利 *S. obliquus* 生長。
15. 當溫度小於或大於  $24^\circ\text{C}$  時，不利的培養環境對菌體的生長造成壓力，使得生物質量下降，油脂累積量提高，約為 33~37%。
16. 光源的添加，*S. obliquus* 進行光合作用釋出氧氣，使共培養 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 較不照光條件下佳。
17. 光強度的增加，使 *S. obliquus* 與 *R. glutinis* 的菌數提高；生長較快速的 *R. glutinis* 對 *S. obliquus* 形成光遮蔽效應。光強度的增加會促進 *R. glutinis* 的生長，卻不利於油脂的累積。
18. 5 L 發酵槽實驗中， $\text{CO}_2$  的添加可以使共培養的效果提高。
19. 6 L 氣舉式發酵反應器顯示光遮蔽效應的影響大於培養基中碳氮源的濃度。

## 5.2. 未來展望

從共培養 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 的實驗結果顯示共培養相對單獨培養有一定的優勢。如何改善因快速的生長速率造成光遮蔽效應，或 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 代謝碳源造成 pH 快速下降將是值得探討的。未來可以藉由內照光的生物反應器使菌體能得到較高的光強度，又碳源濃度的增加可以促進 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 的生長，故可藉批次饋料的方式進行碳源的進料，並控制 pH 值在較適合菌體生長的 6，期能維持較佳的共培養條件。

## 參考文獻

1. 鄭俊明、劉清雲(2007)。微藻產業。科學發展。415 期，34-40。
2. 劉翠玲、許嘉伊(2011)。藻類應用，商機無限：全球水產藻類發展現況與趨勢。全球綠色商機與農業發展趨勢。系列 5-9。
3. 闕壯群(2009)。微藻類：固碳工程。科學發展。433 期
4. 沈宜蓉(2010)。為藻減碳：打造綠色世代新紀元。源雜誌雙月刊 81，4-13。
5. 謝誌鴻、吳文騰(2009)。微藻-綠色生質能源。科學發展。433 期。
6. 謝誌鴻(2009)。微藻培養與微藻油脂生產之研究。國立成功大學化學工程學系博士論文。
7. 鄒樹平(2007)。微藻的綜合開發利用。水產科學，第 26 卷，第 3 期，179-181。
8. 黃英明(2010)。微藻能源技術開發和產業化的發展思路與策略。生物工程學報。Vol. 26，No. 7，907-913。
9. 李光中、劉新校、侯佳慧(2012)。淺談利用微藻固定 CO<sub>2</sub> 實現碳減排。桃園縣大學校院產業環保技術服務團，環保簡訊，第 16 期。
10. 黃昭霖(2009)。LED 在微藻養值之應用。國立宜蘭大學生物機電工程學系學生專題。
11. 潘忠政(2001)。整合鹼液吸收及光合作用以固定二氧化碳。大葉大學環境工程研究所碩士論文。
12. 陳筱祺(2010)。固定化葡萄糖苷轉移酶與酵母菌生產高純度異麥芽寡糖。大

- 同大學生物工程研究所碩士論文。
13. 林煜庭(2002)。黃斑色素形成機轉之研究。國立陽明大學醫學工程研究所碩士論文。
  14. 楊政峯(2007)。以類胡蘿蔔素穩定之微脂粒包覆去氧核糖核酸水解酶之研究。大同大學生物工程研究所碩士論文。
  15. 張雅琪(2008)。嗜鹽菌 *Haloferax mediterranei* 生產類胡蘿蔔素之最適化探討。大同大學生物工程研究所碩士論文。
  16. 張舒婷(2008)。嗜鹽菌 *Haloferax mediterranei* 的類胡蘿蔔素之抗氧化及細胞毒性評估。大同大學生物工程研究所碩士論文。
  17. 張智勇(2011)。探討不同發酵策略對於 *Rhodotorula glutinis* 生長及累積油脂之影響。東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。
  18. 孫證雄(2011)。自營環境下培養柵藻生成葉黃素與超臨界流體萃取葉黃素之探討。東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。
  19. 周廷耀(2002)。碳源的添加對等鞭金藻增殖的影響。國立中山大學還氧生物研究所。
  20. 蔡介中(2011)。探討光品質和漁業廢棄物對 *Chlorella sp.* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 共培養生產油脂之影響。國立中央大學化學工程與材料工程所博士論文。
  21. 張怡塘(2009)。環境微生物實驗第五版。高立圖書有限公司。



- An, G. H. and Johnson, E. A. (1990) Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*, In *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 57 Springer, pp. 191-203.
- Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M. and Guebitz, G. M. (2008) Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production, In *Bioresour Technol*, Vol. 99 Elsevier, pp. 3051-3056.
- Arnal, E., Miranda, M., Almansa, I., Muriach, M., Barcia, J. M., Romero, F. J., Diaz-Llopis, M. and Bosch-Morell, F. (2009) Lutein prevents cataract development and progression in diabetic rats, In *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, Vol. 247 Springer, pp. 115-120.
- Arnal, E., Miranda, M., Almansa, I., Muriach, M., Barcia, J. M., Romero, F. J., Diaz-Llopis, M. and Bosch-Morell, F. (2009) Lutein prevents cataract development and progression in diabetic rats, Vol. 247 Springer, pp. 115-120.
- Balat, M. and Balat, H. (2009) Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel, In *Appl Energy*, Vol. 86 Elsevier, pp. 2273-2282.
- Becker, E. W. (2007) Micro-algae as a source of protein, In *Biotechnology Advances*, Vol. 25 Elsevier, pp. 207-210.
- Bendich, A. and Olson, J. A. (1989) Biological actions of carotenoids, In *The FASEB journal*, Vol. 3 FASEB, pp. 1927-1932.
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N. and Fischer, R. (2005) The *Aspergillus nidulans* Phytochrome FphA Represses Sexual Development in Red Light, In *Current Biology*, Vol. 15 Elsevier, pp. 1833-1838.
- Cai, S., Hu, C. Q. and Du, S. B. (2007) Comparisons of growth and biochemical composition between mixed culture of alga and yeast and monocultures, In *Journal of bioscience and bioengineering*, Vol. 104 Elsevier, pp. 391-397.
- Carpentier, S., Knaus, M. and Suh, M. (2009) Associations between lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration: an overview, In *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, Vol. 49 Taylor & Francis, pp. 313-326.
- Cheirsilp, B., Suwannarat, W. and Niyomdecha, R. (2011) Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock, *New Biotechnology*, **28**, 362-368.
- Coleman, H. and Chew, E. (2007) Nutritional supplementation in age-related macular degeneration, In *Curr Opin Ophthalmol* Springer, pp. 105-111.
- Dai, C., Tao, J., Xie, F., Dai, Y. and Zhao, M. (2007) Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity, In *African Journal of Biotechnology*, Vol. Vol. 6.

- Demirbas, A. (2008) Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections, In *Energy Convers Manage*, Vol. 49 Elsevier, pp. 2106-2116.
- Demirbas, A. (2009) Progress and recent trends in biodiesel fuels, In *Energy Convers Manage*, Vol. 50 Elsevier, pp. 14-34.
- Demirbas, A. (2011) Competitive liquid biofuels from biomass, In *Applied Energy*, Vol. 88 Elsevier, pp. 17-28.
- Demirbas, M. F. (2009) Bio-oils from corn stover via supercritical water liquefaction, In *Energy Educ Sci Technol Part A*, Vol. 23, pp. 97-104.
- Demirbas, M. F. (2010) Microalgae as a feedstock for biodiesel, In *Energy Educ Sci Technol Part A*, Vol. 25, pp. 31-43.
- Demmig-Adams, B. and Adams Iii, W. W. (2002) Antioxidants in photosynthesis and human nutrition, In *Science*, Vol. 298 American Association for the Advancement of Science, pp. 2149-2153.
- Demmig-Adams, B. and Adams, W. W. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis, In *Trends in Plant science*, Vol. 1 Elsevier, pp. 21-26.
- Fatih Demirbas, M. (2009) Biorefineries for biofuel upgrading: a critical review, In *Appl Energy*, Vol. 86 Elsevier, pp. S151-S161.
- Fernández-Sevilla, J. M., Acién Fernández, F. G. and Molina Grima, E. (2010) Biotechnological production of lutein and its applications, In *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 86 Springer, pp. 27-40.
- Graboski, M. S. and McCormick, R. L. (1998) Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines, In *Progress in Energy and Combustion Science*, Vol. 24 Elsevier, pp. 125-164.
- Granado, F., Olmedilla, B., Gil-Martinez, E. and Blanco, I. (2001) A fast, reliable and low-cost saponification protocol for analysis of carotenoids in vegetables, In *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 14 Elsevier, pp. 479-489.
- Heber, D. and Lu, Q. Y. (2002) Overview of mechanisms of action of lycopene, In *Experimental Biology and Medicine*, Vol. 227 Royal Society of Medicine, pp. 920-923.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. and Darzins, A. (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, In *The Plant Journal* Vol. 54, pp. 621-639.
- John, J. H., Ziebland, S., Yudkin, P., Roe, L. S., Neil, H. A. and Oxford, F. (2002) Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial, In *Lancet*,

Vol. 359, pp. 1969.

- 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, In *Microbiology and Biotechnology*, Vol. 8 Springer, pp. 382-384.
- Keskin, A. and Emiroglu, A. O. (2010) Catalytic reduction techniques for post-combustion diesel engine exhaust emissions, In *Energy Educ Sci Technol Part A*, Vol. 25, pp. 87-103.
- Khachik, F. (2007) Process for extraction and purification of lutein, zeaxanthin and rare carotenoids from marigold flowers and plants, US Patent 7,173,145.
- Kim, M. K., Dubacq, J. P., Thomas, J. C. and Giraud, G. (1996) Seasonal variations of triacylglycerols and fatty acids in *Fucus serratus*, Vol. 43 Elsevier, pp. 49-55.
- Kim, M. K., Park, J. W., Park, C. S., Kim, S. J., Jeune, K. H., Chang, M. U. and Acreman, J. (2007) Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater, In *Bioresource technology*, Vol. 98 Elsevier, pp. 2220-2228.
- Krinsky, N. I., Landrum, J. T. and Bone, R. A. (2003) Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye, In *Annual review of nutrition*, Vol. 23 Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, pp. 171-201.
- Malisorn, C. and Suntornsuk, W. (2008) Optimization of beta-carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine, In *Bioresour Technol*, Vol. 99, pp. 2281-2287.
- Mandal, S. and Mallick, N. (2009) Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production, In *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 84 Springer, pp. 281-291.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. and Xian, M. (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms, In *Renewable Energy*, Vol. 34 Elsevier, pp. 1-5.
- Miao, X. and Wu, Q. (2004) High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*, In *J Biotechnol*, Vol. 110, pp. 85.
- Miao, X. and Wu, Q. (2006) Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil, In *Bioresource Technology*, Vol. 97 Elsevier, pp. 841-846.
- Mohammed, A. A. and Shafea, A. A. (1992) Growth and some metabolic activities of *Scenedesmus obliquus* cultivated under different NaCl concentrations, In *BIOLOGIA PLANTARUM*, Vol. 34 Springer, pp. 423-430.
- Ozkurt, I. (2009) Qualifying of safflower and algae for energy, In *Energy Educ Sci*

- Thecnol Part A*, Vol. 23, pp. 145-151.
- Papanikolaou, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2004) Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media, In *Bioresource Technology* Vol. 95 Barking, Essex, England: Elsevier Applied Science; New York, NY: Elsevier Science Publishing Co., 1991-, pp. 287-291.
- Rao, A. R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T. R. and Ravishankar, G. A. (2007) Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents, In *Bioresource*, Vol. 98 Elsevier, pp. 560.
- Renaud, S. M., Thinh, L. V., Lambrinidis, G. and Parry, D. L. (2002) Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures, Vol. 211 Elsevier, pp. 195-214.
- Renaud, S. M., Zhou, H. C., Parry, D. L., Thinh, L. V. and Woo, K. C. (1995) Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp.(clone T. ISO), In *Journal of Applied Phycology*, Vol. 7 Springer, pp. 595-602.
- Richardson, B., Orcutt, D. M., Schwertner, H. A., Martinez, C. L. and Wickline, H. E. (1969) Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture, In *American Society for Microbiology*, Vol. 18 Am Soc Microbiol, pp. 245-250.
- Richmond, A. (2008) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, Wiley-Blackwell.
- Roberts, R. L., Green, J. and Lewis, B. (2009) Lutein and zeaxanthin in eye and skin health, In *Clinics in dermatology*, Vol. 27 Elsevier, pp. 195-201.
- Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T. and Bourtoom, T. (2011) Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids, In *Process Biochemistry*, Vol. 46 Elsevier, pp. 210-218.
- Saidur, R. (2010) Energy, economics and environmental analysis for chillers in office buildings, In *Energy Educ Sci Technol Part A*, Vol. 25, pp. 1-16.
- Sandnes, J. M., K'Ilqvist, T., Wenner, D. and Gislerød, H. R. (2005) Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production, Vol. 17, pp. 515-525.
- Semba, R. D. and Dagnelie, G. (2003) Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health?, In *Med Hypotheses* Vol. 61, pp. 465.
- Shi, X. M. and Chen, F. (1997) Stability of lutein under various storage conditions, In

- Food / Nahrung*, Vol. 41 Wiley Online Library, pp. 38-41.
- Somashekar, D. and Joseph, R. (2000) Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium, In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Vol. 16 Springer, pp. 491-493.
- Stahl, W. and Sies, H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids, In *Molecular aspects of medicine*, Vol. 24 Elsevier, pp. 345-351.
- Suh, I. S. and Lee, S. B. (2001) Cultivation of a cyanobacterium in an internally radiating air-lift photobioreactor, Vol. 13 Springer, pp. 381-388.
- Tukaj, Z., Matusiak-Mikulin, K., Lewandowska, J. and Szurkowski, J. (2003) Changes in the pigment patterns and the photosynthetic activity during a light-induced cell cycle of the green alga *Scenedesmus armatus*, In *Plant Physiology*, Vol. 41 Elsevier, pp. 337-344.
- Westhuizen, A. J. and Eloff, J. N. (1985) Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006), In *Planta*, Vol. 163 Springer, pp. 55-59.
- Williams, P. J. B. and Laurens, L. M. L. (2010) Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics, In *Energy & Environmental Science*, Vol. 3 Royal Society of Chemistry, pp. 554-590.
- Woodall, A. A., Britton, G. and Jackson, M. J. (1997) Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability, In *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, Vol. 1336 Elsevier, pp. 575-586.
- Xue, F., Miao, J., Zhang, X. and Tan, T. (2010) A new strategy for lipid production by mix cultivation of *Spirulina platensis* and *Rhodotorula glutinis*, In *Appl Biochem Biotechnol*, Vol. 160 Springer, pp. 498-503.
- Xue, F., Zhang, X., Luo, H. and Tan, T. (2006) A new method for preparing raw material for biodiesel production, In *Process Biochem*, Vol. 41 Elsevier, pp. 1699-1702.
- Zhang, P., Yuan, M. and Wang, H. (2007) Study on Dissolved Oxygen Control Method Based on International Evaluation Benchmark, In *Information and control*, Vol. 36, pp. 199.
- Zhu, L. Y., Zong, M. H. and Wu, H. (2008) Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation, Vol. 99 Elsevier, pp. 7881-7885.

## 附錄

### 附錄 A

#### (a) Pure culutre

	Biomass (g/L)	Cell counts ( cells/ml)	Cell counts ( cells/L)	Weight ( g/ cell)
Yeast	11.1	$9.21 \times 10^8$	$9.21 \times 10^{11}$	$1.21 \times 10^{-11}$
Algae	1.97	$2.08 \times 10^6$	$2.08 \times 10^9$	$9.47 \times 10^{-10}$

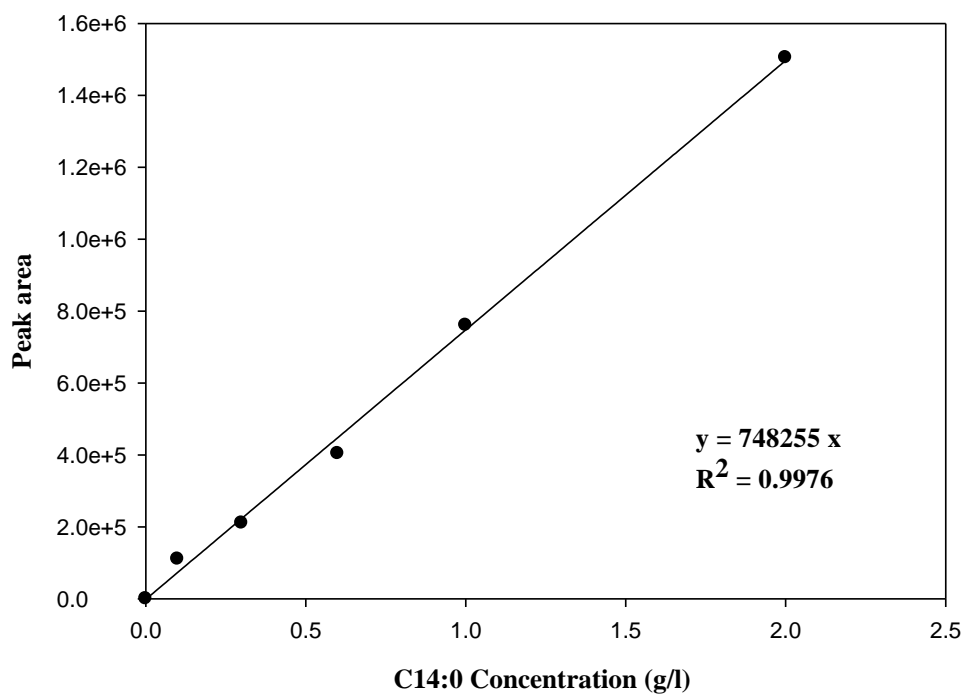
從表(a) Mono-culture 中可以計算出 Algae/ Yeast 的乾重比約為 78.6，藉此換算共培養下的 Algae 與 Yeast 的乾重質，如表(b) Coculture。

#### (b) Coculture

Experimental condition	Biomass (g/L)	cell counts (cells/ ml)		將 Algae 換算成 Yeast 之菌數	Biomass (g/L)	
		yeast	algae		Yeast	Algae
Pure yeast	11.1	$9.21 \times 10^8$	-	-	-	-
Pure algae	1.97	-	$2.08 \times 10^6$	$1.63 \times 10^8$	-	-
Mixed culture	10.27	$5.62 \times 10^8$	$2.50 \times 10^7$	$1.97 \times 10^9$	2.28	7.99

## 附錄 B.1

Methyl tetradecanoate (C14:0) 標準檢量線

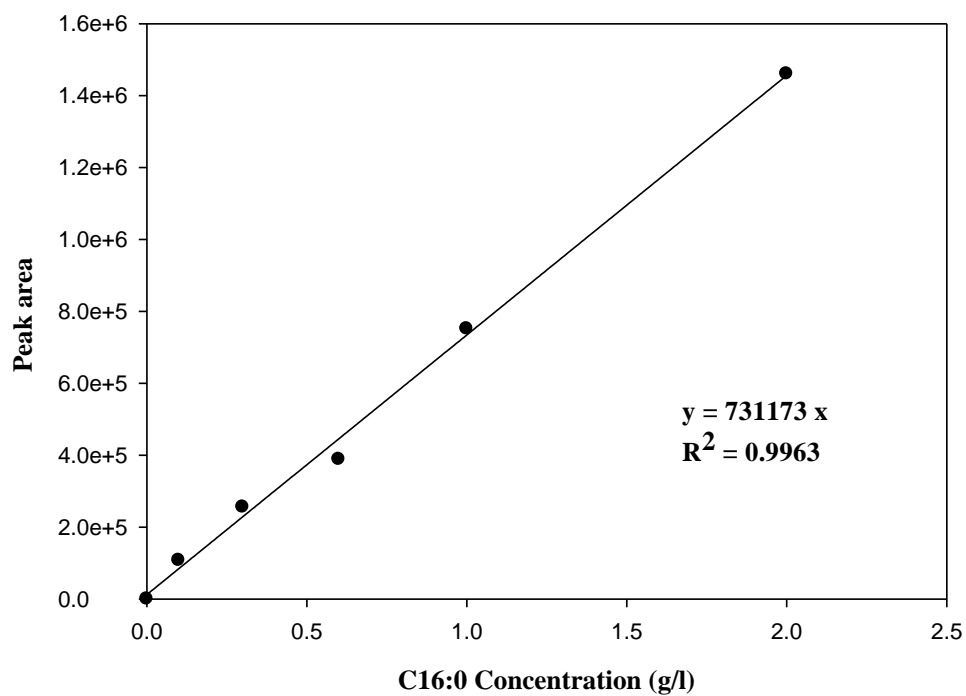


Methyl tetradecanoate (C14:0) 標準檢量線方程式:

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

## 附錄 B.2

Methyl palmitate (C16:0) 標準檢量線



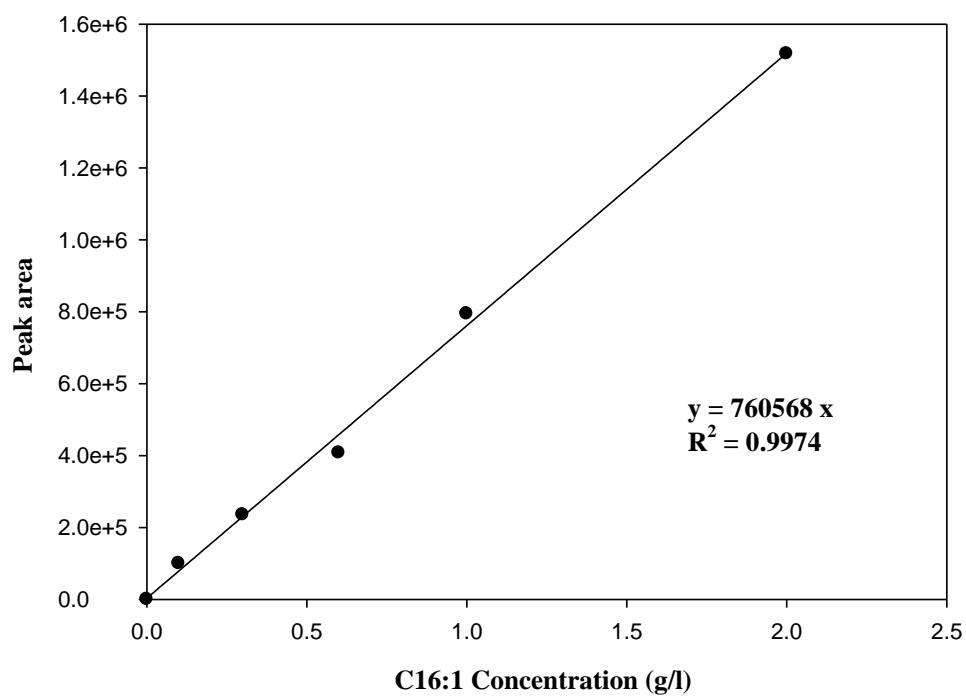
Methyl palmitate (C16:0) 標準檢量線方程式:

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



### 附錄 B.3

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

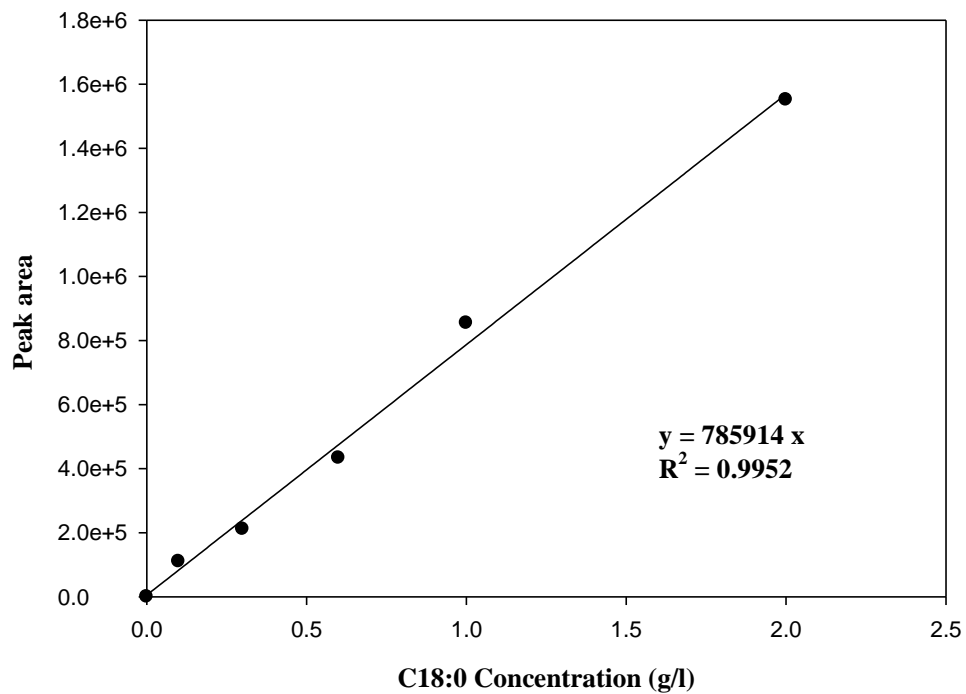


Palmitoleic acid methyl ester (C16:1) 標準檢量線方程式:

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

## 附錄 B.4

Methyl stearate (C18:0) 標準檢量線

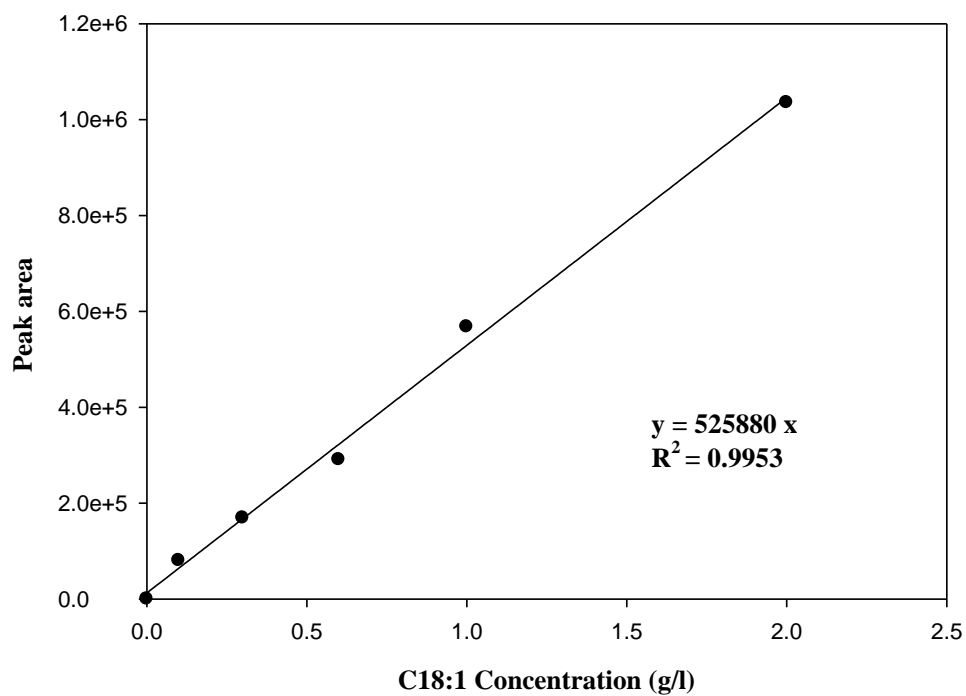


Methyl stearate (C18:0) 標準檢量線方程式:

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

## 附錄 B.5

### Methyl oleate (C18:1) 標準檢量線

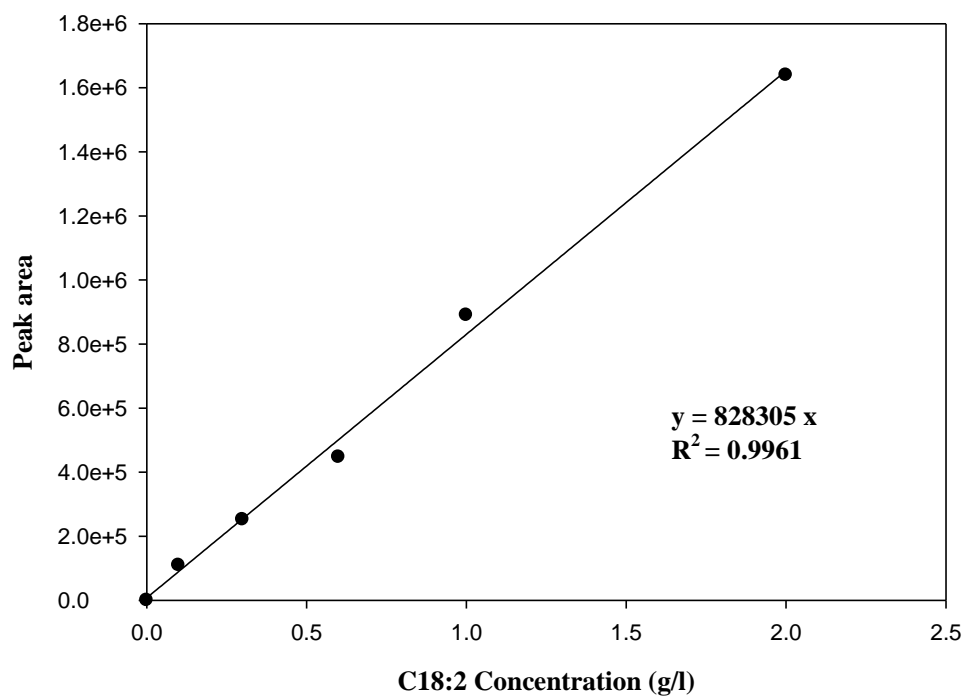


Methyl oleate (C18:1) 標準檢量線方程式:

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

## 附錄 B.6

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

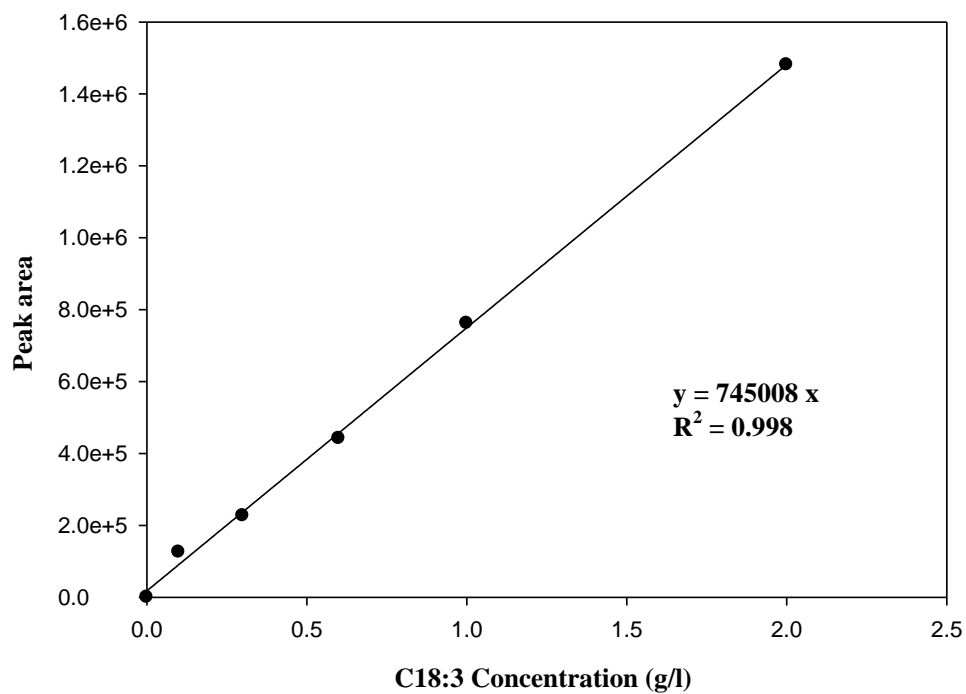


Linoleic acid methyl ester (C18:2) 標準檢量線方程式:

$$\text{Peak area} = 828305 \times (\text{C18:2 Concentration})$$

## 附錄 B.7

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

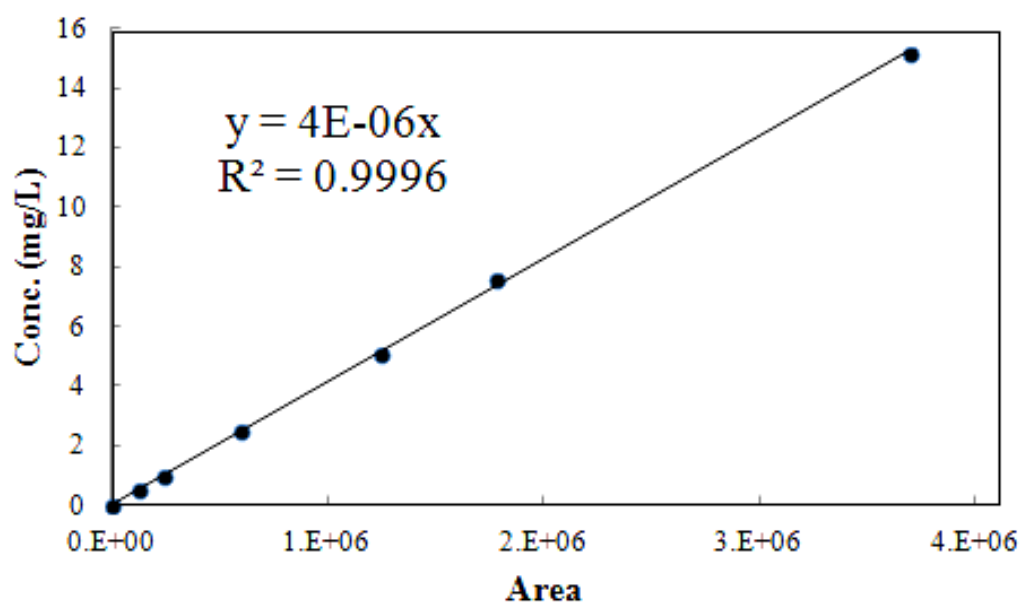


Linolenic acid methyl ester (C18:3) 標準檢量線方程式:

$$\text{Peak area} = 745008 \times (\text{C18:3 Concentration})$$

## 附錄 C

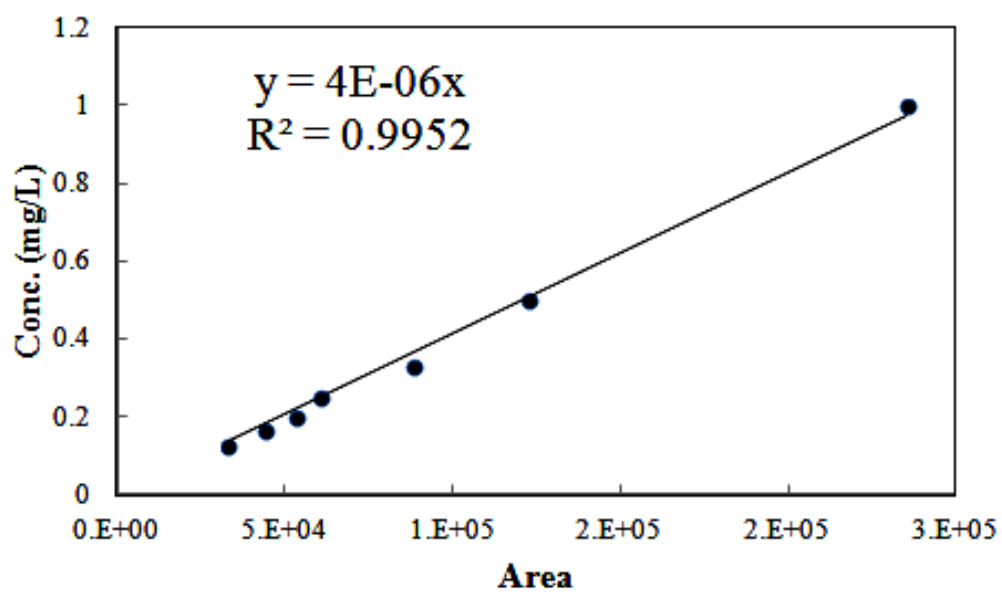
葉黃素(Lutein)檢量線



葉黃素(Lutein)檢量線方程式： $\text{Concentration}(\text{mg/L}) = 4 \times 10^{-6} \times \text{Area}$

## 附錄 D

β-胡蘿蔔素(β-carotene)檢量線



β-胡蘿蔔素(β-carotene)檢量線方程式：Concentration(mg/L) =  $4 \times 10^{-6} \times$  Area

附錄 E

表 4-16 各實驗參數之 *R. glutinis* 與 *S. obliquus* 菌數之比較

Culture condition	Cell count after 96 hr. (cells/mL)		Ratio (Yeast / Algae)
	Yeast	Algae	
Effect of mixed culture			
Pure yeast	$9.21 \times 10^8$	-	
Pure algae	-	$2.08 \times 10^6$	
Coculture	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17
Effect of ratio of yeast and algae			
1 : 8	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17
1 : 41	$6.55 \times 10^8$	$2.75 \times 10^7$	24
Effect of KNO <sub>3</sub> (g/L)			
0.50	$7.84 \times 10^8$	$1.83 \times 10^7$	43
0.75	$7.02 \times 10^8$	$2.10 \times 10^7$	33
1.25	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17
1.50	$4.61 \times 10^8$	$2.20 \times 10^7$	21
2.00	$6.08 \times 10^8$	$2.23 \times 10^7$	27
Effect of KNO <sub>3</sub> / (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 5 (g/L)			
1.25 / 0.25	$6.77 \times 10^8$	$5.33 \times 10^7$	14
0.5 / 0.1	$9.95 \times 10^8$	$5.00 \times 10^7$	19
Effect of Yeast Extract added or not			
1.25 g/L KNO <sub>3</sub>			
YE	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17
No YE	$5.59 \times 10^8$	$2.25 \times 10^7$	25
0.5 g/L KNO <sub>3</sub>			
YE	$7.84 \times 10^8$	$1.83 \times 10^7$	43
No YE	$4.68 \times 10^8$	$1.25 \times 10^7$	37



(接續前頁)

Effect of glucose (g/L)			
25	$7.84 \times 10^8$	$1.83 \times 10^7$	43
35	$8.27 \times 10^8$	$3.21 \times 10^7$	26
50	$7.44 \times 10^8$	$2.13 \times 10^7$	35
100	$7.00 \times 10^8$	$8.75 \times 10^6$	80
Effect of NaCl (g/L)			
0	$4.68 \times 10^8$	$1.25 \times 10^7$	37
0.05	$4.55 \times 10^8$	$1.50 \times 10^7$	30
0.1	$3.61 \times 10^8$	$1.50 \times 10^7$	24
0.2	$5.34 \times 10^8$	$2.88 \times 10^7$	19
Effect of 0.05 g/L NaCl adding time (hr.)			
0	$4.68 \times 10^8$	$1.25 \times 10^7$	37
24	$5.34 \times 10^8$	$1.42 \times 10^7$	38
48	$5.06 \times 10^8$	$1.17 \times 10^7$	43
72	$5.90 \times 10^8$	$1.75 \times 10^7$	34
Effect of initial pH			
6	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17
7	$6.85 \times 10^8$	$1.54 \times 10^7$	44
8	$6.20 \times 10^8$	$1.71 \times 10^7$	36
Effect of temperature (°C)			
22	$1.04 \times 10^9$	$1.00 \times 10^8$	10
24	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17
26	$4.95 \times 10^8$	$3.27 \times 10^7$	15
Effect of light intensity ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )			
47	$4.68 \times 10^8$	$1.25 \times 10^7$	37
86	$7.03 \times 10^8$	$2.08 \times 10^7$	34
115	$6.89 \times 10^8$	$1.25 \times 10^7$	55
Effect of baffle			
Without	$5.56 \times 10^8$	$3.33 \times 10^7$	17
With	$7.56 \times 10^8$	$1.67 \times 10^7$	45

附錄 F

表 4-17 各實驗參數的生物質量、油脂累積、油脂含量與產率之比較

Culture condition	Biomass (g/L)	Total lipid (g/L)	Total lipid content (%)	Yield (g/g)
Effect of mixed culture				
Pure yeast	11.1 ± 0.44	1.777 ± 0.278	16.00 ± 2.21	0.071
Pure algae	2.0 ± 0.06	0.370 ± 0.015	18.71 ± 0.22	0.021
Coculture	14.1 ± 0.07	3.594 ± 0.250	25.57 ± 1.65	0.120
Effect of ratio of yeast and algae				
01:08	14.1 ± 0.07	3.594 ± 0.251	25.57 ± 1.65	0.120
01:41	16.1 ± 1.63	4.235 ± 1.235	28.85 ± 2.77	0.139
Effect of KNO <sub>3</sub> (g/L)				
0.5	13.3 ± 0.85	3.392 ± 0.187	25.53 ± 2.47	0.136
0.75	13.2 ± 0.14	3.190 ± 0.111	24.22 ± 1.10	0.128
1.25	14.1 ± 0.07	3.594 ± 0.251	25.57 ± 1.65	0.120
1.5	12.4 ± 0.44	3.150 ± 0.536	25.33 ± 2.48	0.126
2	11.6 ± 2.01	2.960 ± 0.637	25.37 ± 1.41	0.119
Effect of KNO <sub>3</sub> / (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 5 (g/g)				
1.25 / 0.25	13.8 ± 0.38	2.675 ± 0.166	19.32 ± 0.73	0.105
0.5 / 0.1	13.5 ± 0.75	2.523 ± 0.097	19.19 ± 0.01	0.101
Effect of Yeast Extract added or not				
1.25 g/L KNO <sub>3</sub>				
YE	14.1 ± 0.07	3.594 ± 0.251	25.57 ± 1.65	0.120
No YE	10.2 ± 0.40	2.675 ± 0.166	19.32 ± 0.73	0.117
0.5 g/L KNO <sub>3</sub>				
YE	13.3 ± 0.85	3.392 ± 0.187	25.53 ± 2.47	0.136
No YE	8.27 ± 0.00	2.885 ± 0.299	34.90 ± 3.58	0.147
Effect of glucose (g/L)				
25	13.3 ± 0.85	3.390 ± 0.187	25.53 ± 2.47	0.136
35	14.4 ± 0.36	4.326 ± 0.889	30.02 ± 5.94	0.155
50	15.1 ± 1.04	5.952 ± 0.392	39.34 ± 1.05	0.238
100	14.0 ± 0.25	5.067 ± 0.171	36.29 ± 1.64	0.323

(接續前頁)

Effect of NaCl (g/L)				
0	8.23 ± 0.30	2.885 ± 0.299	34.90 ± 3.58	0.147
0.05	8.07 ± 0.35	3.272 ± 0.120	40.64 ± 2.92	0.207
0.1	7.63 ± 0.40	3.129 ± 0.149	41.02 ± 1.62	0.176
0.2	7.40 ± 0.30	2.818 ± 0.277	38.03 ± 2.34	0.151
Effect of 0.05 g/L NaCl adding time (hr.)				
0	8.07 ± 0.35	3.272 ± 0.120	40.64 ± 2.92	0.207
24	8.97 ± 0.12	2.722 ± 0.053	30.36 ± 0.83	0.118
48	9.57 ± 0.35	2.960 ± 0.243	30.92 ± 1.74	0.131
72	9.27 ± 0.25	2.936 ± 0.848	31.63 ± 8.65	0.129
Effect of initial pH				
6	13.33 ± 0.85	3.390 ± 0.187	25.53 ± 2.47	0.136
7	11.87 ± 0.45	3.540 ± 0.131	29.91 ± 1.90	0.166
8	11.63 ± 0.31	2.870 ± 0.869	24.56 ± 6.90	0.125
Effect of temperature (°C)				
22	10.57 ± 0.76	3.730 ± 1.013	36.77 ± 12.87	0.148
24	14.05 ± 0.07	3.590 ± 0.251	25.57 ± 1.65	0.120
26	10.43 ± 0.15	3.430 ± 0.158	32.94 ± 1.97	0.146
Effect of illumination				
Without	6.67 ± 0.15	1.440 ± 0.330	21.31 ± 4.67	0.066
With	14.05 ± 0.07	3.590 ± 0.251	25.57 ± 1.65	0.120
Effect of light intensity (μmol/m <sup>2</sup> s)				
47	8.27 ± 0.12	2.885 ± 0.300	34.90 ± 3.58	0.147
86	8.87 ± 0.58	2.213 ± 0.580	25.25 ± 7.98	0.106
115	9.20 ± 0.40	2.161 ± 0.405	23.59 ± 5.00	0.103
Effect of Baffle				
Without	14.05 ± 0.07	3.590 ± 0.251	25.57 ± 1.65	0.120
With	10.53 ± 0.50	1.450 ± 0.368	13.68 ± 3.02	0.058

## 附錄 G

*R. glutinis* 之發酵培養基(Fermentor medium, FM)組成為 *R. glutinis* 進行種子培養後所使用之培養基，在共培養實驗中以共培養培養基(CCM)取代。

表 4-18 *R. glutinis* 之發酵培養基(Fermentor medium, FM)

Components	Concentration(g/L)
Glucose	30
Yeast extract	2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1
NaCl	0.1

## 個人簡歷

姓 名： 陳儷娟 (Lijuan Chen)

籍 貫： 台灣省彰化縣花壇鄉

出生年月日： 1989/02/10



學 歷： 東海大學化學工程與材料工程研究所 (畢)

---

教育背景	學校	科(系)別	畢業日期
高中	彰化高商	綜合高中科	民國 96 年 6 月
大學	東海大學	化學工程與材料工程學系	民國 100 年 6 月
研究所	東海大學	化學工程與材料工程 研究所	民國 102 年 2 月

---

經 歷：

2008 志願服務基礎訓練課程/志願服務特殊訓練課程 研習

2010 國科會大專生參與專題研究計畫(NSC 99-2815-C-029-011-E)

2012 基盛生物技術股份有限公司 計畫兼任助理

2012 榮獲 101 年度台灣石化合成股份有限公司獎學金

2013 綠色永續生物技術研討會 結業



2012/09/15 實驗室成員於司馬庫斯巨木合影