

私立東海大學化學工程暨材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏宏偉博士

Advisor : Hong-Wei Yen, Ph.D.

海水與滅菌策略對於黏紅酵母菌於氣舉式發酵槽中生長之影響性

Effects of seawater and sterilization strategy on the growth of

Rhodotorula glutinis in an airlift bioreactor

研究生：廖于婷 撰

Graduate student : Yu-Ting Liao

中華民國 104 年 7 月

July, 2015

誌 謝

從大學專題到研究所這段時間遇到很多不同的事情，感謝這一路受到很多人的幫助和照顧，首先要非常感謝指導教授 顏宏偉老師，在這長達三年的過程中，一路從大學生到研究生的角色轉換中給了非常多的建議以及教誨，使我在求學的路上即使艱辛也受益匪淺，老師的鼓勵也轉換成了人生前進的動力，推著我往人生下一個階段繼續邁進，在此謹致上由衷的謝意。同時感謝中興化工所 劉永銓教授、成大化工所 張嘉修教授、元智生技所 魏毓宏教授、大同生工所 游吉陽教授，於口試期間給予寶貴的建議，在此致上最誠摯的謝意。

在大學專題至研究所的求學過程中，感謝學長姐鴨子、金門、芒果、欣培、金杉、Laco、娟姐、西瓜、小喵、一毛、小孟、義成、容慈、阿凱、旻玉的指導與照顧，也感謝同學陳奴、車車、俊星、奕瑋、宜婷的互相鼓勵與照顧，以及感謝學弟妹翔翔、噁淵、蘇國、昭翰、變態綸、洪洪、安安、裕仁等，在我求學過程中增加許多歡笑，有許多不同的回憶，增添了研究過程中的樂趣。另外感謝過程中幫助我的陳正麒先生、系辦學姐們、以及系上老師，你們的幫助使得求學過程更加豐富與順利。最後，謹將此論文獻給我的父母以及家人，感謝他們的付出以及在精神上的支持與鼓勵，才可以讓我順利的完成研究，謝謝你們。

2015 年 7 月 28 日

中文摘要

Rhodotorula glutinis (BCRC 22360) 是株能迅速累積高油脂的酵母菌，其生長快速、可進行高密度細胞培養，且能以廢棄物粗甘油作為碳源，兼具環保價值，因此具有相當高發展潛力。本研究利用此菌株快速生長特性，改變滅菌策略以及將培養基配製由純水置換成海水，並選用氣舉式發酵槽進行培養，以探討對 *Rhodotorula glutinis* 生長及油脂含量的影響性。

生質柴油在歐美國家以普遍應用於交通工具中，大部分料源來自甘蔗、大豆等糧食作物，造成需求面積廣大的問題，台灣土地面積狹小、人口密度高等環境限制下更凸顯出困境，若能以海水培養富含高油脂的 *R. glutinis*，便可解決土地利用和成本過高的問題。

本實驗中所使用的 5 L 氣舉式發酵槽中，將一般培養微生物的純水換成全海水，*R. glutinis* 濃度可達到 15.9 g/L，最大油脂濃度也可達 12.4 g/L 與使用純水相差無幾，顯示其可在全海水下的環境生存，所以海水是可以取代 RO 水的。然而在發酵工程中，高溫滅菌以保持單一菌種生長環境，是一個必要但相當耗能的過程，所以本研究進一步探討改變培養基酸鹼值以取代高溫滅菌，降低發酵培養過程的能耗，結果顯示黏紅酵母菌進行不滅菌培養(pH 5.5)，在 39 hr 即受到抑制無法繼續增加濃度，於是改其生長 pH 由 5.5 調降至 4.0 且不滅菌；*R. glutinis* 最終濃度能達到 11.7 g/L，但降低 pH 卻會導致油脂含量下降，此實驗發現在 48 hr，*R. glutinis* 濃度為 5.8 g/L，在此菌體濃度下，*R. glutinis* 有機會成為槽體內優勢菌種，於是改採用兩階段 pH 控制策略，起始 pH 4.0 不滅菌並在 48 hr 後將 pH 調升為 5.5，兩階段 pH 的發酵策略雖可以有效增加菌體濃度與油脂含量，但其效果與控制組 *R. glutinis* 濃度相距達 5 g/L 之多，在完全不滅菌下，*R. glutinis* 菌體

濃度將遠低於控制組。雖然此種做法可以降低生產成本，但大幅的降低了菌體最終濃度，因此採用不滅菌的做法在商業化生產上較為不可行。

關鍵字： *R. glutinis*、海水、不滅菌

Abstract

Rhodotorula glutinis (BCRC 22360) is an oleaginous that can accumulate copious quantities of lipid. As compared to plant seed oil, *R. glutinis* grew fast with high lipid content biomass, therefore it is a potential alternative oil resource for biodiesel production. In this study, the effects of seawater and sterilization strategy to enhance the growth of *R. glutinis* and lipid production in airlift bioreactor.

Biodiesel as the renewable energy been applied to vehicle in USA and Europe currently being produced from cane or soybean etc. But the problem of land usage and densely populated in Taiwan, maybe it can be solved by using seawater to cultivate *R. glutinis*.

In a 5 L airlift bioreactor, the experiments by using the medium of seawater can lead to the biomass of 15.9 g/L and the max total lipid of 12.4 g/L. It mains that *R. glutinis* can grow in the environment of seawater. In the fermentation engineering, sterilization is an important and necessary process to avoid the contamination. However, it also demands lots of energy consumption. So the use of non-sterile fermentation would also effectively decrease the fermentation process cost. The pH control at low level was adopted to replace the heat sterilization process. As a result was found that non-sterilization at pH 5.5 hours was contaminated by germ after 39 hours cultivation. Therefore, a decrease in the growth pH from 5.5 to 4.0 led to an increase in the biomass of *R. glutinis* at 11.7 g/L with the medium non-sterilized. Nevertheless, the low pH could reduce the lipid content. In this study, a two-stage of pH control was proposed, which the pH was controlled at 4.0 and adjusted to 5.5 after

the growth stepping into the stable phase. Conclusively, the results of this study indicated that the two-stage pH control can significantly enhance the lipid content, but the total lipid was still lower than that of control. Non-sterilization can solve the problem for the high cost but it seriously influenced the production of biomass and lipid content. It was not available.

Keywords: *Rhodotorula glutinis* 、 seawater 、 non-sterilization

目錄

中文摘要.....	II
Abstract.....	IV
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2.1 生質柴油.....	2
2.1.1 生質柴油副產物-粗甘油.....	4
2.1.2 β -胡蘿蔔素 (β -carotene).....	6
2.2 產油微生物.....	7
2.2.1 微生物油脂.....	9
2.3 微生物產油機制.....	11
2.4 影響微生物油脂產量因子.....	15
2.4.1 溫度.....	15
2.4.2 pH 值.....	15
2.4.3 光.....	15
2.4.4 碳源和氮源.....	16
2.4.5 碳源.....	17
2.4.6 氮源.....	17

2.4.7	無機鹽和微量元素.....	17
2.5	紅酵母菌 (<i>Rhodotorula</i>)	18
2.5.1	菌種選擇- <i>Rhodotorula glutinis</i>	19
2.6	海水.....	20
2.7	幫助溶氧物質 (Oxygen-vector)	22
2.7.1	界面活性劑 Tween-80.....	22
2.8	發酵策略.....	23
2.8.1	批次微生物油脂發酵.....	23
2.8.2	兩階段培養策略.....	23
第三章	材料與方法.....	24
3.1	實驗材料.....	24
3.1.1	菌株.....	24
3.1.2	實驗藥品.....	25
3.2	實驗儀器.....	27
3.3	分析方法.....	29
3.3.1	菌體濃度分析方法.....	29
3.3.2	葡萄糖濃度分析方法.....	29
3.3.3	總脂質濃度分析方法.....	29

3.3.4	甘油分析方法.....	29
3.4	實驗方法.....	31
3.4.1	原始菌種保存.....	31
3.4.2	培養基組成.....	31
3.4.3	搖瓶發酵培養基 (Fermentation medium, FM)	32
3.4.4	接菌.....	33
3.5	實驗架構.....	34
3.6	實驗培養條件.....	35
3.6.1	搖瓶批次發酵程序 (Flask Experiments)	35
3.6.1.1	不同 pH 值之影響.....	35
3.6.1.2	不同 pH 值且不滅菌之影響.....	35
3.6.1.3	改變氯化鈉濃度之影響.....	35
3.6.1.4	不同海水含量培養基之影響.....	36
3.6.1.5	添加幫助溶氧物質之影響.....	36
3.6.2	5 L 氣舉式批次發酵程序 (Fermentation Experiments).....	37
3.6.2.1	不滅菌之影響.....	37
3.6.2.2	兩階段培養.....	37
3.6.2.3	在 90°C 下滅菌之影響.....	38

3.6.2.4	全海水培養基之影響.....	38
3.6.2.5	添加界面活性劑之影響.....	39
3.6.3	50 L 氣舉式批次發酵程序 (Fermentation Experiments).....	39
3.6.4	100 L 氣舉式批次發酵程序 (Fermentation Experiments).....	40
3.7	實驗裝置圖.....	40
3.7.1	搖瓶發酵培養裝置圖.....	41
3.7.2	5 L 氣舉式批次發酵培養裝置圖.....	42
3.7.3	50 L 氣舉式饋料發酵培養裝置圖.....	43
3.7.4	100 L 氣舉式饋料發酵培養裝置圖.....	44
第四章	結果與討論.....	45
4.1	不滅菌發酵程序.....	45
4.1.1	搖瓶批次發酵程序.....	45
4.1.1.1	滅菌並降低 pH 值影響.....	45
4.1.1.2	不滅菌並降低 pH 值影響.....	48
4.1.2	5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序.....	50
4.1.2.1	改變酸鹼值之影響性.....	50
4.1.2.2	兩階段控制酸鹼值之影響.....	56
4.1.2.3	在 90°C 下滅菌之影響性.....	58

4.1.3	5 L 氣舉式發酵槽綜合探討	61
4.2	海水培養基發酵程序.....	64
4.2.1	搖瓶批次發酵程序.....	64
4.2.1.1	鹽度之影響.....	64
4.2.1.2	不同海水比例之影響.....	66
4.2.2	5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序	68
4.2.2.1	海水培養基之影響性.....	68
4.2.3	50 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序	72
4.2.3.1	海水培養基之影響性.....	72
4.2.4	海水培養基之成本影響性.....	75
4.3	添加幫助溶氧物質之發酵程序.....	77
4.3.1	搖瓶批次發酵程序.....	77
4.3.1.1	添加物質之影響.....	77
4.3.1.2	添加界面活性劑之影響.....	79
4.3.2	5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序	81
4.3.2.1	添加界面活性劑之影響.....	81
4.3.3	體積溶氧係數 k_La	84
4.4	100 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序	85

4.5 海水培養基與添加界面活性劑及 100 L 之氣舉式生物反應器之綜合探討.....	86
第五章 結論與未來展望.....	89
5.1 結論.....	89
5.2 未來展望.....	90
參考文獻.....	91
附錄.....	95
作者簡歷.....	96

圖目錄

圖 2-1	生質柴油	3
圖 2-2	在柴油中添加 2 % 生質柴油的 B2	3
圖 2-3	β -胡蘿蔔素結構	6
圖 2-4	檸檬酸循環代謝圖	12
圖 2-5	脂肪酸累積代謝圖	13
圖 2-6	The fatty acid and TAG biosynthesis pathway in microorganisms.....	14
圖 3-1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	24
圖 3-2	<i>Rhodotorula glutinis</i> 之搖瓶實驗裝置圖	41
圖 3-3	5 L 氣舉式發酵槽裝置圖	42
圖 3-4	50 L 氣舉式發酵槽裝置圖	43
圖 3-5	100 L 氣舉式發酵槽裝置圖	44
圖 4-1	在滅菌情形下，改變酸鹼值（pH 1.5、pH 2.0、pH 2.5、pH 3.0、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.0、pH5.5）培養 48 hr，探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響性	46
圖 4-2	在滅菌情形下，改變酸鹼值（pH 3.0、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.0、pH 5.5）培養 48 hr，探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響(培養基中剩餘甘油量表示為 R-glycerol)	46
圖 4-3	在不滅菌情形下，改變酸鹼值（pH 3.0、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.5）培養 48 hr，探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	49

圖 4-4	改變培養基酸鹼值 (pH 4.0) 且不滅菌對 <i>R. glutinis</i> 的生長影響	51
圖 4-5	pH 4.0 且不滅菌與控制組的菌體濃度和油脂累積率比較.....	51
圖 4-6	pH 4.0 且不滅菌菌液稀釋 1000 倍在平板上之生長情形.....	52
圖 4-7	培養基酸鹼值 (pH 5.5) 且不滅菌對 <i>R. glutinis</i> 的生長影響	53
圖 4-8	pH 5.5 且不滅菌與控制組的菌體濃度和油脂累積濃度比較.....	54
圖 4-9	pH 5.5 且不滅菌菌液稀釋 1000 倍在平板上之生長情形.....	54
圖 4-10	5 L 氣舉式發酵槽, <i>R. glutinis</i> 在 pH 4.0 且不滅菌下培養 159 hr 之變化情形.....	55
圖 4-11	5 L 氣舉式發酵槽, <i>R. glutinis</i> 在 pH 5.5 且不滅菌下培養 63 hr 之變化情形	55
圖 4-12	兩階段控制酸鹼值 (pH 4.0 到 pH 5.5) 且不滅菌對 <i>R. glutinis</i> 的生長影響	56
圖 4-13	兩階段控制酸鹼值且不滅菌與控制組的菌體濃度和油脂累積濃度比較	57
圖 4-14	5 L 氣舉式發酵槽, <i>R. glutinis</i> 在兩階段控制酸鹼值且不滅菌下培養 168 hr 之變化情形.....	57
圖 4-15	在 90°C 下滅菌對 <i>R. glutinis</i> 的生長影響	59
圖 4-16	在 90°C 下滅菌與控制組的菌體濃度和油脂累積濃度比較	59
圖 4-17	在 90°C 下滅菌菌液稀釋 1000 倍在平板上之生長情形	60
圖 4-18	5 L 氣舉式發酵槽, <i>R. glutinis</i> 在 90°C 下滅菌下培養 111 hr 之變化情形	60

圖 4-19	不滅菌程序中，對 <i>R. glutinis</i> 菌體濃度之影響性	62
圖 4-20	不滅菌程序中，對 <i>R. glutinis</i> 油脂濃度之影響性	62
圖 4-21	改變鹽度(0.1、10、20、30、40 g/L)培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響	65
圖 4-22	改變海水濃度(0、25、50、75、100 %)培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響	66
圖 4-23	在全海水培養基下對 <i>R. glutinis</i> 的生長影響	69
圖 4-24	在全海水培養基與控制組的菌體濃度和油脂累積含量比較	69
圖 4-25	在 5L 氣舉式發酵槽，全海水培養基與控制組的滲透壓比較	70
圖 4-26	5 L 氣舉式發酵槽， <i>R. glutinis</i> 在全海水培養基下培養 183 hr 之變化情形	71
圖 4-27	在全海水培養基下對 <i>R. glutinis</i> 的生長影響	73
圖 4-28	在全海水培養基與控制組的菌體濃度和油脂累積含量比較	73
圖 4-29	在 50 L 氣舉式發酵槽，在全海水培養基與控制組的滲透壓比較	74
圖 4-30	添加幫助溶氧物質 (tween 80、oleic acid、n-hexane、control)培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響	78
圖 4-31	添加界面活性劑 (0 g/L、5 g/L、10 g/L、20 g/L) 培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響	79
圖 4-32	添加界面活性劑 5 g/L 對 <i>R. glutinis</i> 的生長影響	81

圖 4-33	添加界面活性劑 5 g/L 與控制組的菌體濃度和油脂累積含量比較.....	82
圖 4-34	5 L 氣舉式發酵槽， <i>R. glutinis</i> 在添加界面活性劑 5 g/L 下培養 159 hr 之變化情形.....	83
圖 4-35	利用動態溶氧方法測試不同界面活性劑添加量（0 g/L、5 g/L、10 g/L、15 g/L）並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響性.....	84
圖 4-36	在 100 L 氣舉式發酵槽中培養對 <i>R. glutinis</i> 的生長影響.....	85

表目錄

表 2-1 粗甘油微量元素分析表	5
表 2-2 Oil content of some microorganisms	8
表 2-3 Lipid composition of some microorganisms.....	10
表 2-4 Average concentrations of the major ions in seawater, in parts per thousand by weight.....	21
表 3-1 實驗藥品清單	25
表 3-2 實驗儀器清單	27
表 3-3 種子培養基	31
表 3-4 發酵培養基	32
表 4-1 在滅菌情形下，改變酸鹼值 (pH 3.0、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.0、pH 5.5) 培養 48 hr，探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響之實驗數據.....	47
表 4-2 在不滅菌情形下，改變酸鹼值 (pH 3.0、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.5) 培養 48 hr，探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響之實驗數據.....	49
表 4-3 對於累積油脂比較，各發酵槽實驗之動力學參數整理	63
表 4-4 改變鹽度(0.1、10、20、30、40 g/L)培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	65
表 4-5 改變海水濃度(0、25、50、75、100 %)培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	67

表 4-6 在 5 L 氣舉式發酵槽，全海水和控制組 (RO 水) 培養基，對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	70
表 4-7 在 50 L 氣舉式發酵槽，全海水和控制組 (RO 水) 培養基，對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	74
表 4-8 各地區 (大陸、東南亞、台灣、美國) RO 水機所使用之價格.....	76
表 4-9 添加幫助溶氧物質 (tween 80、oleic acid、n-hexane、control) 培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	78
表 4-10 添加界面活性劑 (0 g/L、5 g/L、10 g/L、20 g/L) 培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	80
表 4-11 添加界面活性劑 5 g/L 對 <i>R. glutinis</i> 的生長影響.....	82
表 4-12 在 100 L 氣舉式發酵槽中培養對 <i>R. glutinis</i> 的生長影響.....	85
表 4-13 對於累積油脂比較，各發酵槽實驗之動力學參數整理.....	87
表 4-14 累積油脂之發酵槽實驗與文獻之比較.....	88

第一章 緒論

隨著人口增長與科技的進步，不論是生活或工業方面對燃料的需求量都越來越大，全球石化燃料日益短缺、價格持續飆漲，能源耗竭及環境生態變遷更是全球關注的議題，迫使各國皆面臨開發新能源以及能源永續系統的新技術挑戰。

生質柴油是具有發展性的替代生物燃料之一，西方國家已利用甘蔗、玉米、大豆等植物進行生產，並且添加於化石燃料中利用，進而引發了與人爭地、與民爭糧等的重大問題，對於台灣而言，地理位置四面環海的環境限制下，所能利用的生質柴油來源也受侷限，所以目前利用細菌、酵母菌與微藻等富含油脂的微生物進行發酵成為目前備受關注的議題。

在製造生質柴油的過程中，會產生副產物-粗甘油，而其中含有 40 % 至 70 % 甘油、0 % 至 10 % 的鹽、8 % 至 50 % 的水分及低於 5 % 甲醇和 0.5 % 脂肪酸 (Stelmachowski, 2011)，為一種廢棄物。而本實驗所使用菌株，黏紅酵母菌 (*Rhodotorula glutinis*) 是能迅速累積高油脂的菌株，其生長快速且能以廢棄物粗甘油作為碳源，兼具環保價值，本研究利用此菌株特性改變其環境因子、培養基組成並於氣舉式發酵槽中進行培養，探討其菌體生長及代謝產物之影響性。

第二章 文獻回顧

2.1 生質柴油

柴油引擎 (diesel engine) 由德國工程師 Rudolf Diesel (1858-1913) 發明設計，將其所使用燃料稱為柴油 (diesel oil)，且在巴黎博覽會上，展示了使用花生油作燃料的發動機。但隨著石油大量的開採、低成本及適用於任何機械的特性，促使生質燃料製備的研究隨之停擺。直到世界石油危機和環保意識的高漲，使得生質柴油等替代能源的研究逐漸受到重視。生質柴油的研究推廣是從 20 世紀的 70 代開始，由德國、美國、法國、義大利等相繼成立了專門的生質柴油的研究機構。到了 20 世紀的 90 年代，歐盟訂定發展生質能政策、法規、指令與優惠手段，例如歐盟 2003/30/EC 號指令「生質能用量佔燃油用量於 2005，需達 2% 至 2010，需達 5.75% 目標」品質需符合 EN 14214。美國也在 1990 年開始以小規模，利用產製豆粕副產物大豆油生產生質柴油，進行推廣應用，美國能源部要求到 2010 年止，美國的生質柴油產量從現有的 100 萬噸提高到 1200 萬噸，使生質柴油迅速成為新經濟的產業之一 (許惠美, 2000)，如圖 2-1 為生質柴油、圖 2-2 為台灣所使用添加 2% 生質柴油的 B2。

生質柴油是以取代石化柴油為目標的替代能源，利用轉酯化技術將植物油或動物油脂轉化為物理及化學性質都與烴類化合物相當類似的脂肪酸酯。相較於石化燃料其具有生物可降解性、無毒性、高潤滑性和高十六烷值，可混合石化柴油使用於常規的燃料發動機，並且不需要特殊修改引擎 (Ullah et al., 2014)。生質柴油的料源種類廣泛，舉凡向日葵油、大豆油、棕櫚油等植物油或是油炸過後的廢食用油都可作為生質柴油的原料，但是植物油易受限於土地和生長週期長所限制，雖然目前利用微生物產油的成本較植物油高，但經由改善製程方法可大幅度提升

微生物產油過程，除此之外，也不受到氣候的影響，且含油微生物的生命週期短而在適當條件下可以產生高達總細胞重 60 % 的脂質(Rhee et al., 1983; Li et al., 2007)。含油酵母菌或黴菌所合成的多不飽脂肪酸非常相似植物油，使含微生物有利於作為的生物柴油產業原料(Easterling et al., 2009)。微生物油脂累積量與組成如表 2-1。



圖 2-1 生質柴油



圖 2-2 在柴油中添加 2 % 生質柴油的 B2

2.1.1 生質柴油副產物-粗甘油

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

為了能有效的利用粗甘油，有許多方法創新粗甘油的用途，如燃燒、堆肥、動物飼料補給、熱化學轉化。其中，作為餵養家畜補充的研究上顯示添加粗製甘油高達 30 % 左右，可以取代乾物質且對於攝取量及副作用沒有任何明顯的影響。粗甘油之甘油組成占總重 95.3 % 一般以低價轉賣於甘油精煉廠，因為甘油的應用非常廣泛，可添加於化妝品、食品、藥品或作為各種化學品生產的原料，由於粗甘油內含有甲醇、氫氧化鈉酯類，少量硫化化合物，蛋白質、微量元素（Thompson et al., 2006）等，因此純化的步驟難以避免花費成本偏高。

在微生物培養基中，細胞需要碳源來合成產物，在文獻指出，以粗甘油作為 *Pichia pastoris* 發酵培養基的碳源，所得到的細胞濃度及紅血球生成素是以純甘油作為發酵碳源的 1.4 倍，顯示出粗甘油所含的微量元素對於生物體有正面的影響性（Eda et al., 2008），表 2-1 是分析經由不同的料源製成生質柴油，所得到粗甘油的內容物。除此之外，粗甘油也可作為碳源用於生產高價值的化合物，如 1,2-丙二醇（Dasari et al., 2005），聚脂纖維（Stumbe et al., 2004），聚甘油（Clacens et al., 2002）。

表 2-1 粗甘油微量元素分析表(Thompson et al., 2006)

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

*BDL：表示低於檢測分析方法的相應極限值。

2.1.2 β -胡蘿蔔素 (β -carotene)

β -胡蘿蔔素(β -carotene)，屬於四萜化合物包含了八個異戊二烯(Malisorn et al., 2009)，化學式 $C_{40}H_{56}$ ，分子量 536.87 gmol^{-1} ，顏色呈現橙色至黃色，其結構是如圖2-3 所示，其名稱中的 β -標記即由環中雙鍵的共軛位置而得來的，廣泛地存在於植物和動物組織中。

由於 β -胡蘿蔔素具有抗癌和抗氧化的活性，所以普遍被用作食物著色劑、飼料、化妝品和藥物的添加劑產品 (Silva et al., 1990)，除此之外，膳食研究表明，對於無吸菸者，適量攝取 β -胡蘿蔔素能預防癌症和其他疾病。

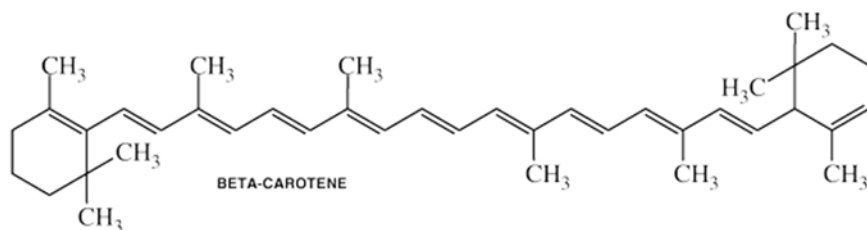


圖 2-3 β -胡蘿蔔素結構

2.2 產油微生物

當全球的生質柴油產能急速擴張，歐美、東南亞國家開始大量種植大豆、玉米等，提煉植物油來供給生產料源，但植物油佔地面積大且受制於季節氣候的改變，所以為符合這項需求，研發植物油以外的其他來源的油脂正在迅速發展中，欲增加全球油脂產量並降低對於生態系的衝擊，其中一個途徑是使用產油微生物（oleaginous microorganisms）的油脂，產油微生物包括微藻、細菌、真菌與酵母菌（Liu et al., 2014），與產油植物比較，產油微生物培養不受限於耕地，因此不會與食品的生產競爭。在細胞內，若可累積超過 20 % 的油脂，即可稱為產油微生物（Subhash et al., 2011）。如表 2-2 為微生物可累積的油脂比例。

表 2-2 Oil content of some microorganisms (Yang et al. 2009)

Microorganisms	Oil content (% dry wt)	Microorganisms	Oil content (% dry wt)
Microalgae		Yeast	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
Bacterium		Fungi	
<i>Arthrobacter sp.</i>	>40	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38	<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25	<i>Humicola lanuginosa</i>	75
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24	<i>Mortierella vinacea</i>	66

2.2.1 微生物油脂

由產油微生物生產的油脂，或稱為單細胞油脂（single cell oil）（Liu et al., 2014），微生物在一定條件下利用碳源、氮源和無機鹽類生產的油脂，它可以作為花生四烯酸和二十二碳六烯酸的來源。這些油脂在嬰幼兒食品和老年人保健食品中應用廣泛。現在已經有明確清晰地臨床證據表明腦組織中的脂肪酸很大一部分是花生四烯酸和二十二碳六烯酸。它們可以促進嬰兒的神經和智力發育。另外，花生四烯酸可以有助於減少冠心病的發生。除此之外，也可利用微生物培養生產 EPA、DHA 等營養價值高且具有特殊保健功能的油脂。

大部分微生物油的脂肪酸組成和一般植物油相近，如表 2-3，以 C16 和 C18 系脂肪酸，如油酸、棕櫚酸、亞油酸和硬脂酸為主要，微生物油脂可替代植物油生產生質柴油。由於技術原因，過去單細胞很少有規模化生產的報導，但隨著工業生物技術的發展，微生物油脂技術不斷取的進展。

表 2-3 Lipid composition of some microorganisms (Yang et al., 2009)

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

2.3 微生物產油機制

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

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

以下分別簡述 acetyl-CoA 及 NADPH 的生成機制：

acetyl-CoA

1. 當氮源用盡，細胞內 AMP deaminase 活性上升，約為氮源尚未用盡時的五倍。

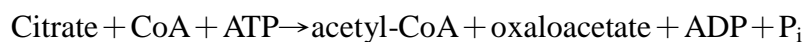
2. 隨著 AMP deaminase 活性上升，細胞內與粒線體中的 AMP 濃度下降。



3. 由於 AMP 濃度下降，isocitrate dehydrogenase 也跟著停止運作。

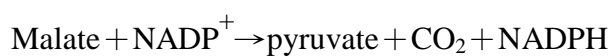
4. isocitrate dehydrogenase 的停止，造成 isocitrate 無法被代謝而且藉著 Aconitase 與 citric acid 達成平衡。

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



II. NADPH

經由 malic enzyme 可得 NADPH:



以上文字敘述可由圖 2-4 表示：

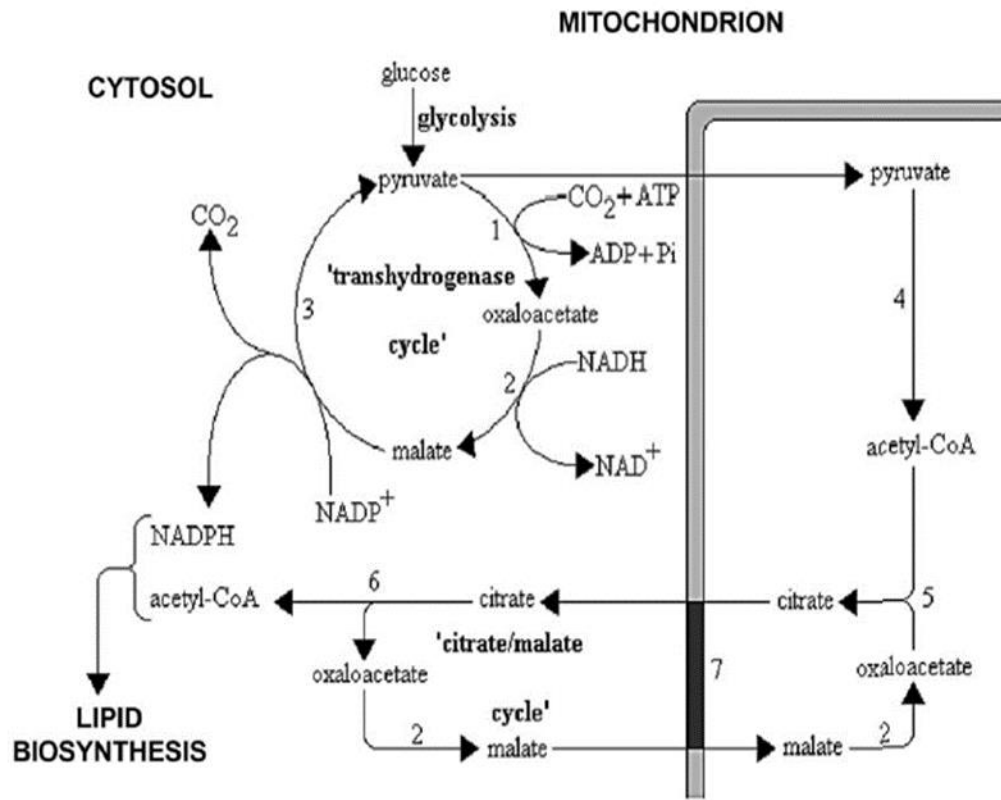


圖 2-4 檸檬酸循環代謝圖 (Ratledge., 2004)

綜合以上，可由圖 2-5、2-6 表示整個油脂的累積機制：

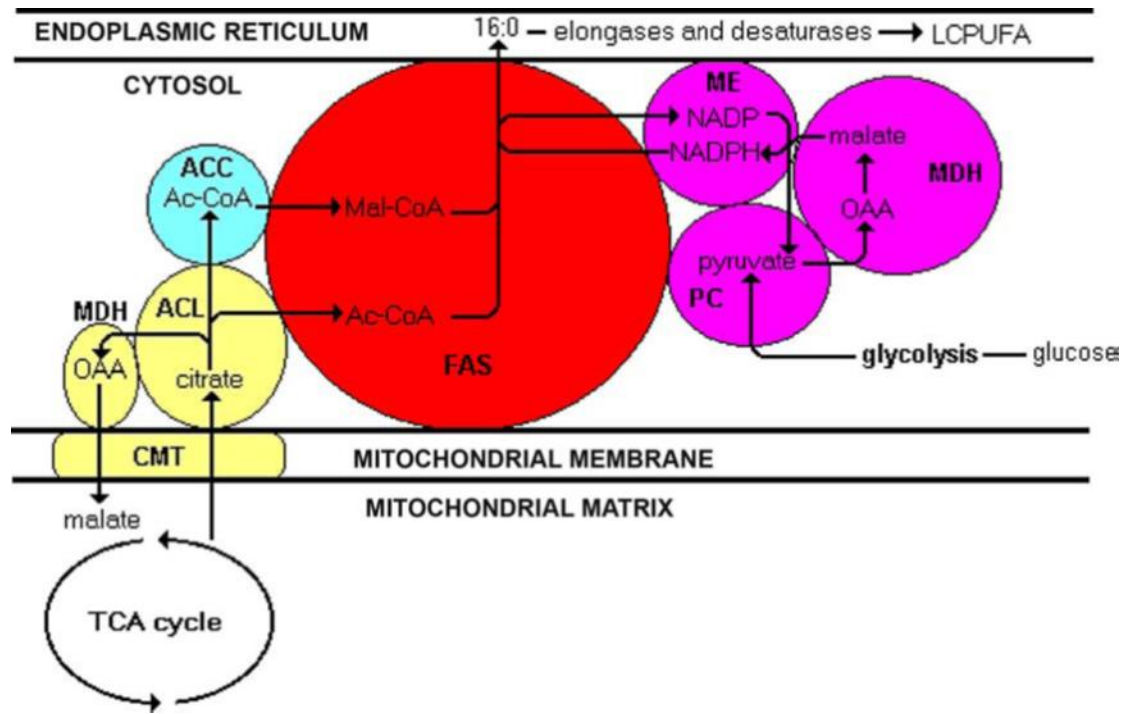


圖 2-5 脂肪酸累積代謝圖 (Ratledge., 2004)

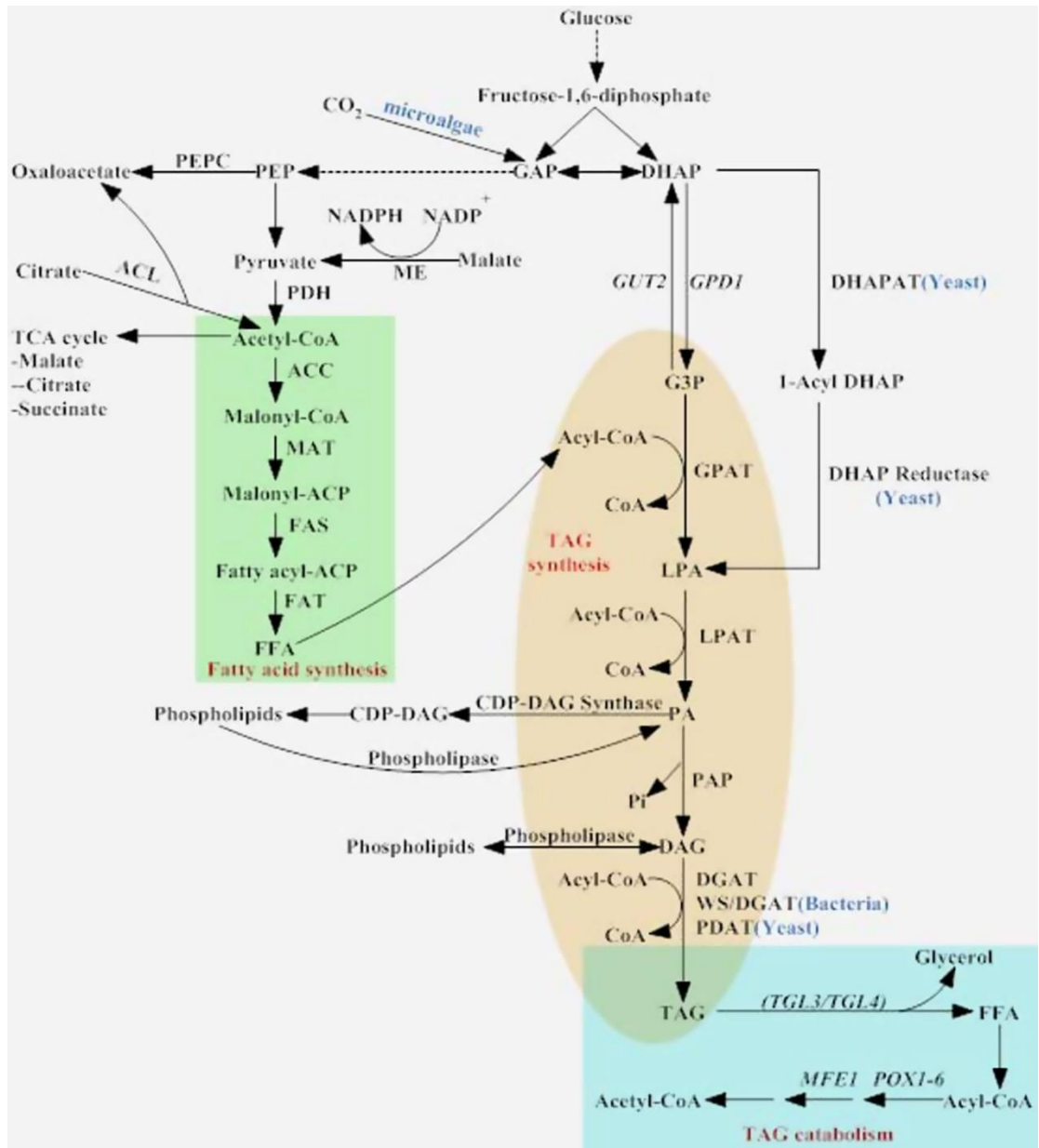


圖 2-6 The fatty acid and TAG biosynthesis pathway in microorganisms.(Liang et al., 2013)

2.4 影響微生物油脂產量因子

微生物在細胞內累積油脂的生理循環，已經獲得充分的研究，根據文獻的佐證，微生物生長在碳源（甘油、葡萄糖、蔗糖等）過剩相對氮源（peptone、硫酸銨等）受到限制的條件下（Zhang et al., 2014），才能更有效的產生並儲存油脂於細胞中。因此，微生物成長與累積油脂受到培養基中碳氮比（carbon-to-nitrogen ratio）和其他因素，如溫度、pH、無機鹽與微量元素等影響。

2.4.1 溫度

環境中，溫度對於微生物的生長和產物累積有重大的影響性，由於溫度會直接的影響細胞中酵素的反應及活性，又間接與菌體的生長和產物相關，文獻中指出，溫度的改變確實能影響脂質的生成，當 *R. glutinis* 培養基溫度控制在 30°C 時，培養 45 小時前可增加油脂的含量，而之後調低生長溫度在室溫 25°C，可再進一步提升其累積量（Zhang et al., 2014），但當溫度高於 35°C 時，不利 *R. glutinis* 的生長，而溫度低於 20°C，菌體生長速率則會趨向遲緩，因此必須視菌體最佳的培養溫度而定。

2.4.2 pH 值

培養基的酸鹼值往往左右了培養基裡養分的溶解度，以及對微生物的質傳，甚至影響與生長有關的酵素反應，而培養基中 pH 值的改變也會影響細胞內外的離子平衡、細胞的滲透性及細胞膜的結構組成改變。根據文獻指出，*R. glutinis* 在偏酸性的環境下，能獲得較高的油脂含量（Johnson et al., 1992）。

2.4.3 光

光是植物的維持生命所必須，直接影響了植物的生長與發育，這是一般我們所熟悉的光源重要性，但不只是植物，也有文獻指出光會影響藻類的代謝，例如

光會影響 *Spirulina platensis* 代謝類胡蘿蔔素、藻藍素及葉綠素等 (Danesi et al., 2004)。

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

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

而由前人的實驗中，分別探討不同光強度對菌體影響之結果可知，以光強度控制在三盞 LED ($3849.9 \mu\text{mole/s/m}^2$) 下擁有最高的油脂生長速率 0.34 g/L/hr ，利於油脂生產，所以對 *R. glutinis* 來說光確實也是影響油脂累積的因素之一。

2.4.4 碳源和氮源

影響微生物生長最重要的就是營養源，直接關乎培養基的組成，特別是基質組成中占重要比重的碳源和氮源，影響著微生物生理狀態的程度更直接。碳源和氮源是微生物合成細胞時所需要的成分，但在碳源足夠而氮源欠缺的情形下，微生物不再增加菌量，而是將所吸收的碳源轉為脂質。因此，選擇適合的碳源與氮源來培養油脂性的酵母菌是使其達到高產油量的關鍵。

2.4.5 碳源

碳源為供應細胞生長的能量以及骨架形成的必須來源，若採用有機物作為碳源則稱為異營（heterotrophic）生物，反之如果採用二氧化碳作為碳源，則稱為自營（autotrophic）生物。碳源可提供細胞良好的生長，但是濃度過高時會對菌體有抑制情形出現，因為濃度高時期培養基的滲透壓也較高。據文獻指出，選擇利用生質柴油工廠的副產物粗甘油或木質纖維素之水解糖化液作為碳源，對 *R. glutinis* 生產油脂及類胡蘿蔔素來進行探討，可以有效降低生產成本和解決與民爭時與人爭地的問題（Saengea et al., 2011）。

2.4.6 氮源

氮源是構成菌體蛋白質和核酸的主要元素，一般而言，氮源並不提供菌體所需能量，氮源種類可分為：(1) 無機氮源：例如銨鹽與其他含氮的無機鹽類如氯化銨、磷酸二銨、硝酸銨、硫酸銨等；(2) 含碳的有機氮源：例如 Yeast extract、黃豆粉、尿素、peptone 等。

2.4.7 無機鹽和微量元素

磷在細胞能量轉移方面扮演了重要的角色，磷脂質與核酸的合成也需要有磷的存在，因 ω -3 系多元不飽和脂肪酸主要存在細胞的極性之脂質中，如磷脂質，因此磷也會影響多元不飽和脂肪酸的合成。根據文獻指出，培養基中的碳磷比（C/P），會直接影響到 *R. glutinis* 累積脂質的含量（Wu et al., 2010）。

另外，微生物的生長也需要硫、矽、鎂、鐵、銅以及鋅等元素，一般為酵素的輔因子，硫為胺基酸組成的元素之一，可於不同的胺基酸與維生素中發現；矽是微生物膜組成因子之一，是產生不飽和脂肪酸之 EPA 的必需營養因子，缺乏矽時微生物則會利用細胞內儲存的矽，以維持生理活性功能。

2.5 紅酵母菌 (*Rhodotorula*)

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

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

2.5.1 菌種選擇-*Rhodotorula glutinis*

Rhodotorula glutinis 屬於紅酵母菌之一，也屬於腐生菌一類，抗逆性強，廣泛分布於各種生態中(余依環, 2012)。是一種好氧性菌體，在外觀上，細胞的型態呈卵圓形，菌落為紅色，並廣泛的分佈在各種生態中，適合生長在 20~30 °C，pH5~6 的環境，而粘紅酵母菌所累積的油脂中不飽和脂肪酸所佔的含量高達 72 % 以上，主要以油酸(C18:1)佔 50~60 %、棕櫚油(C16:0)佔 20~30 %，且類似於植物油，因此適合作為製造生質柴油的油脂，微生物發酵產油對於未來能源的發展具有相當大的潛力，並且 *R. glutinis* 的單細胞有較快速的生長速度以及能利用低成本發酵培養基的特色，與藻類相比具有當地優勢(Suntornsuk et al., 2008)。

2.6 海水

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

目前已被發現海水化學物質及元素有 92 種，其中 11 種（氯、鈉、鎂、硫、鈣、鉀、溴、鋇、硼、碳、氟）占海水溶解物質總量的 99.8%，其它含量甚微；目前可以從海水中提取 60 多種化學物質。海洋生物所需的元素取自海水，如表 2-4，碳、鉀、硫等元素；氮、磷、矽等元素，能滿足生物的需要，也是生物必需的營養元素。根據文獻指出，利用海水培養 *Rhodotorula glutinis* 可以有效增加其菌體量和類紅蘿蔔素的產量，可由 12 g/L 和 70 mg/L 提升至 16 g/L 和 86 mg/L。(Bhosale et al., 2000)

表 2-4 Average concentrations of the major ions in seawater, in parts per thousand by weight.
(Wright et al., 1995)

ion	‰ by weight
Chloride, Cl^-	18.980
Sulphate, SO_4^{2-}	2.649
Bicarbonate, *HCO_3^-	0.140
Bromide, Br^-	0.065
Borate, H_2BO_3^-	0.026
Fluoride, F^-	0.001
Sodium, Na^+	10.556
Magnesium, Mg^{2+}	1.272
Calcium, Ca^{2+}	0.400
Potassium, K^+	0.380
Strontium, Sr^{2+}	0.013
Overall total salinity	34.482

* Includes carbonate, CO_3^{2-}

2.7 幫助溶氧物質 (Oxygen-vector)

在氣舉式發酵槽中，利用氣體帶動培養基的流動，藉由流動達到質傳也提供菌體所需的氧氣，在大型的槽體中增加溶氧和氣體在培養中滯留時間可有效提升其菌體產量，其中一個方法就是添加非水相態且能幫助增加溶氧的物質 (Oxygen-vector) (Narta et al., 2010)。關於 Oxygen-vector 有很多可能的機制可幫助其作用於培養基中，其中較有可能的是假設 Oxygen-vector 可吸附至氣泡表面，形成不完整的薄膜，而氧氣就可經由此層薄膜在氣泡與微生物之間擴散傳遞 (McMillan et al., 1987)，其可以有效的幫助提升溶氧、成本低廉、低危害性、降低能源消耗等優點，常使用的有烴類、脂肪酸等 (Jianlong., 2000; Rols et al., 1990; Xu et al., 2007)。

2.7.1 界面活性劑 Tween-80

界面活性劑依其性質而言，其吸附配向力大，具有某些生理活性，在目前實際的應用領域上，陽離子性界面活性劑對於革蘭陽性及陰性菌具有強大抗菌性 (馮昌宇, 2009)。Tween-80 主要是由兩種不飽和脂肪酸：油酸 (oleic acid, C18 : 1, 約 70%)、亞麻油酸 (linoleic, C18 : 2) 以及兩種飽和脂肪酸：硬脂酸 (stearic acid, C18 : 0)、棕櫚酸 (palmitic acid, C16 : 0) 所組成。

在文獻當中指出，以非離子界面活性劑 Tween-80 為培養基碳源，對於以油脂類為碳源的微生物而言，Tween-80 的水解速率較慢，在培養過程中以控制釋放的模式，可以有效地避免了油酸抑制的問題 (Chen et al., 2001)，也有研究顯示在培養基中添加非離子界面活性劑 Tween 系列，有助於微生物降解碳氫化合物，對於生態的保育有相當好的助益 (莊, 2002)，在文獻中也有利用添加 Tween-80 幫助溶氧以提升 *Streptomyces* 菌體產量，添加 0.5% 的 Tween 後增加 1 g/L 的菌體濃度 (Xu et al., 2014)。

2.8 發酵策略

2.8.1 批次微生物油脂發酵

批次發酵是最普遍用於發酵產品上，其原因是批次發酵是在一個密閉系統及固定濃度的培養基中，接入微生物菌種進行培養，在培養期間，其培養系統沒有與外界物質進行交換作用，所以污染機率較低，但也因為與外界隔絕與工作體積固定，無補充碳氮源，故通常在批次環境下培養，其生產速率偏低。但批次發酵程序簡單且產率高，對於研究初期，是必要的研究程序。

2.8.2 兩階段培養策略

透過單一變因之探討後，在進行到兩階段培養模式。兩階段培養策略在於第一階段：細胞生長期（Growth phase）時，提供細胞成長所適合的環境，如溶氧量、pH、溫度等，以大幅縮短菌體數量到最大值的時間，穩定成長之後，即進入第二階段：脂肪合成期（Production phase），利用饋料或改變操作參數，如碳源濃度、溶氧、溫度等方法，來有效累積微生物油脂。

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

第三章 材料與方法

3.1 實驗材料

3.1.1 菌株

此實驗採用的 *Rhodotorula glutinis* (圖 3.1)，是購自生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center)，菌種編號：BCRC 22360。

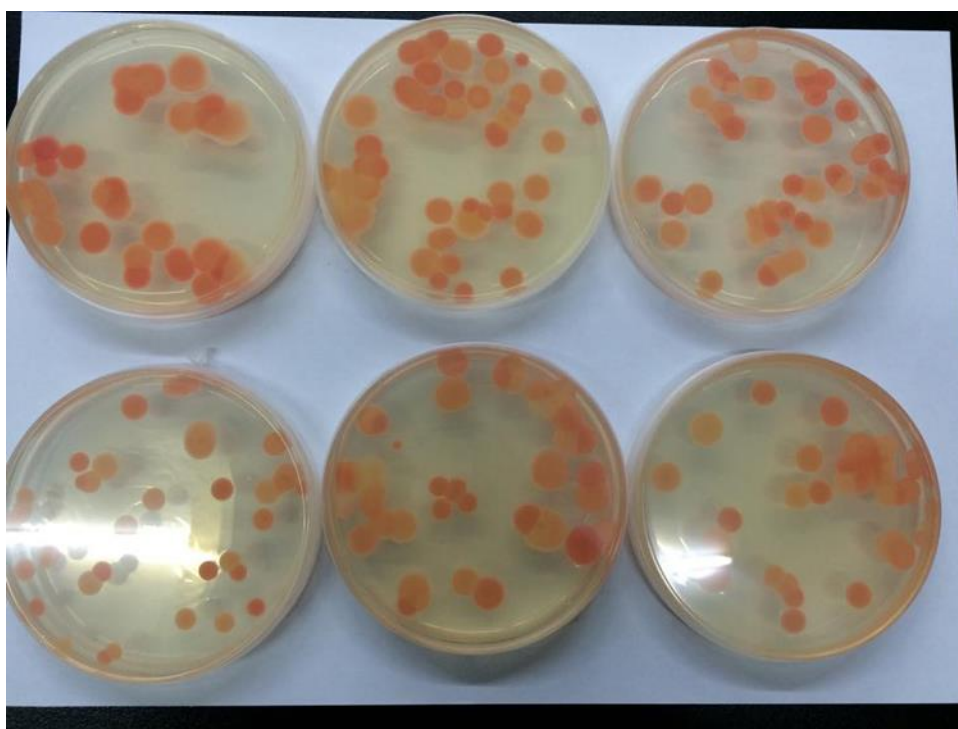


圖 3-1 *Rhodotorula glutinis*

3.1.2 實驗藥品

表 3-1 實驗藥品清單

中文名	英文名	廠牌
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
粗甘油	Crude glycerol	又華股份有限公司
YM BROTH	Yeast Malt Broth	ST BIO
酵母萃取物	Yeast extract	DIFCO BD
硫酸銨	Ammonium sulfate	SHOWA
硫酸鎂	Magnesium sulfate heptahydrate	SHOWA
磷酸二氫鉀	Potassium dihydrogen phosphate	SHOWA
氯化鈣	Calcium dichloride dehydrate	聯工化學試藥
氯化鈉	Sodium chloride	SHOWA
鹽酸	Hydrochloric acid	AENCORE
硫酸	Sulfuric acid	Scharlau
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	SHOWA
甲醇	Methanol	ECHO
乙醇	Ethanol	ECHO
乙酸乙酯	Ethyl acetate	ECHO

異丙醇	Propan-2-ol	ECHO
氯仿	Chloroform	Seedchem
乙腈	Acetonitrile	ECHO
檸檬酸鈉	Trisodium citrate	SHOWA
界面活性劑	Tween 80	ECHO
正己烷	n-hexane	ECHO
油酸	Oleic acid	ECHO
次氯酸鈉	Sodium hypochlorite solution	SHOWA
亞硝醯鐵氰化鈉	Sodium nitroprusside	ACROS
酚	Phenol	ECHO

3.2 實驗儀器

表 3-2 實驗儀器清單

儀器設備	廠牌	型號
電子天平	Precisa	BJ 100M
磁石攪拌加熱器	CORNING	PC-420D
pH 計	INSPECTED	PL-700PV
高壓蒸氣滅菌釜	TRIDENT	EA635
無菌操作台	HIGH TEN	3BH-24
恆溫震盪培養箱	LIAN SHEN	LUS-150
高壓蒸氣滅菌釜	TRIDENT	EA635
超純水機	RODA	
5 公升氣舉式發酵槽	Biotop	
15 公升攪拌式發酵槽	Biotop	
50 公升氣舉式發酵槽	Biotop	
100 公升氣舉式發酵槽	Biotop	
高效液相層析儀 UV detector	Hitachi	L-2400
高效液相層析儀 RI detector	Hitachi	RI 5450
高效液相層析儀 Pump	Hitachi	L-2130/ 5110

高效液相層析儀 Auto Sampler	Hitachi	L-2200/ 5210
紅外線水分蒸發儀	IR 35	DENVER INSTRUMENT
微電腦分光光度計	Thermo	GENESYS 10UV
高速中型離心機	Hettich	Universal-32R
數位型離心機	HSIANTAI	CN-2200
葡萄糖分析儀	YSI	2300STAT
冷凍乾燥機	PAN CHUM	CT-series
Air compressors	SWAN	DR Series
Vacuums pump	EDWARDS	RV Rotary Vane Pumps
超音波震盪破碎儀	MISONIX	S-3000
烘箱	LIAN SHEN	LO-150
超音波震盪器	DECTA	DC300H
大扭力直流攪拌機	SHIN KWANG	DC-1S
氣相層析儀	Thermo	Focus GC

3.3 分析方法

3.3.1 菌體濃度分析方法

取出 5 ml 菌液，在轉速 7000 rpm 下離心 10 min，去除上清液取得菌體，再加入 5 ml RO 水，經試管震盪器使菌體與 RO 水充分混合洗去雜質後，再以相同轉速與時間下離心，去除上清液，取出下層菌體並利用紅外線水分蒸發儀，測得菌體乾重(Dry cell weight, DCW)。

3.3.2 葡萄糖濃度分析方法

將菌液置入離心管中，用離心機以轉速 7000 rpm 下離心 10 min，分離菌體和上清液，取上清液並稀釋 10 倍後，利用 YSI 2300STAT Glucose analyzer 來量測。

3.3.3 總脂質濃度分析方法

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

3.3.4 甘油分析方法

取 10 ml 發酵液，以轉速 7000 rpm 離心 10 min，取上清液並稀釋 10 倍，以 0.45

μm針筒過濾器過濾。

利用HPLC(Hitachi RI detector 5450, Hitachi pump 5110, Hitachi Auto Sampler 5210, Hitachi High-Technology Corporation, Japan) 分析甘油濃度，分析條件：管柱C18 (Vercopak N5ODS, 250 mm ×4.6 mm, Taiwan)，移動相為0.01 N H₂SO₄，流速 0.4 mL/min，注射量50 μL。

3.4 實驗方法

3.4.1 原始菌種保存

將購自菌種中心的 *Rhodotorula glutinis* 之冷凍乾燥管，接至 YM BROTH (Yeast Malt Broth) 液態培養基活化，並放入恆溫培養箱中以 24°C 培養 72 hr，取 0.8 ml 菌液和 0.2 ml 無菌甘油於微量離心管中均勻混合後，放入 4°C 冰箱保存。

3.4.2 培養基組成

3.4.2.1 種子培養基 (Seed culture medium, SM)

依表 3-3 種子培養基之比例配製，即為 Yeast Malt Broth (YM BROTH)，並以 1 N HCl 調整 pH 值為 5.5。

表 3-3 種子培養基

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

3.4.3 搖瓶發酵培養基 (Fermentation medium, FM)

依表 3-4 發酵培養基之比例配製，並以 1 N HCl 調整 pH 值為 5.5。

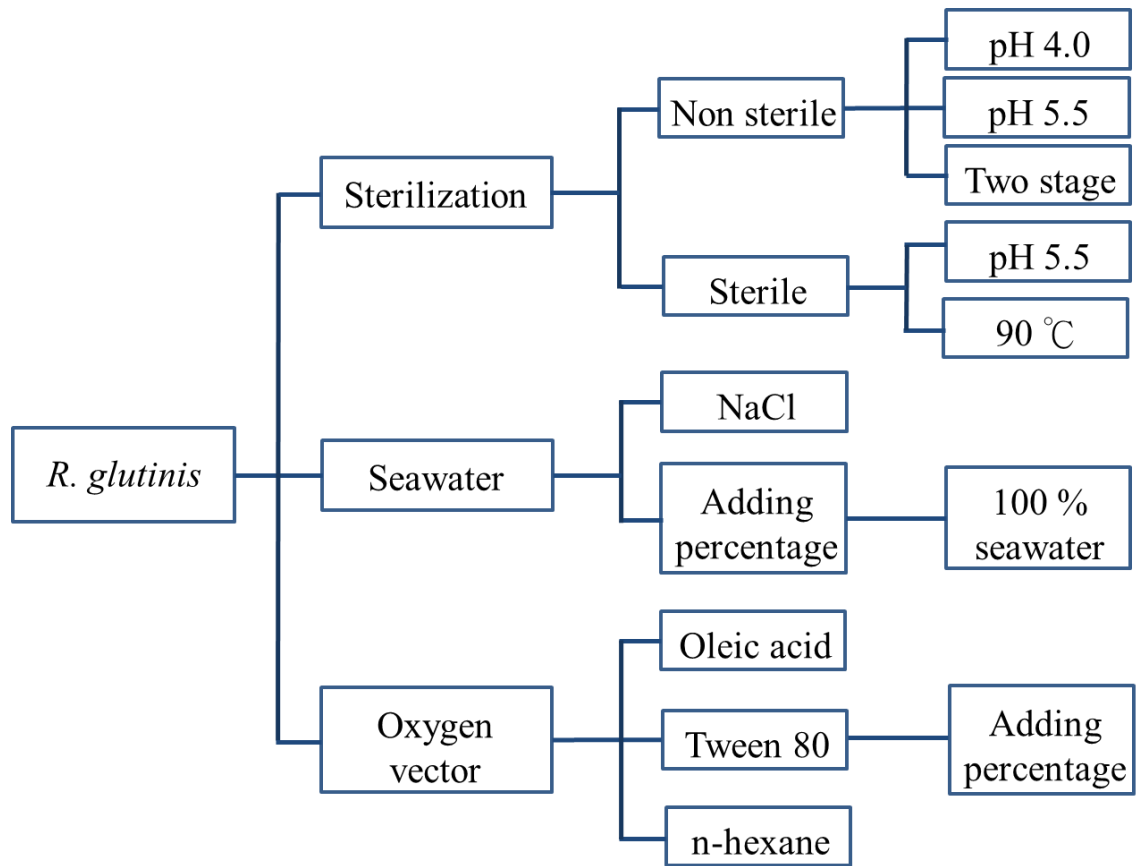
表 3-4 發酵培養基

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

3.4.4 接菌

將培養 24 hr 之 Seed medium 接至 Fermentation medium 中，搖瓶、5 L airlift 部分之接菌量為 Fermentation medium 10%之體積，50 L airlift、100L airlift 部分之接菌量為 Fermentation medium 1%之體積。

3.5 實驗架構



3.6 實驗培養條件

3.6.1 搖瓶批次發酵程序 (Flask Experiments)

3.6.1.1 不同 pH 值之影響

目的：探討不同 pH 值下，對菌體生長、脂質累積之影響。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 24hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。
分別改變其 pH 值 (5.5、5.0、4.5、4.0、3.0、2.0)
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 48hr。

3.6.1.2 不同 pH 值且不滅菌之影響

目的：探討不同 pH 值且不進行滅菌下，對於菌體生長、脂質累積之影響。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 24hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。
3. 分別改變其 pH 值 (5.5、4.5、4.0、3.0) 且不進行滅菌。
4. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。

3.6.1.3 改變氯化鈉濃度之影響

目的：探討改變培養基中氯化鈉的濃度對菌體生長和脂質累積的影響性。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 24hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。
3. 分別改變其培養基中氯化鈉的濃度 (0.1 g/L、10 g/L、20 g/L、30 g/L、40 g/L)
4. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。

3.6.1.4 不同海水含量培養基之影響

目的：探討使用海水做為溶劑對於菌體生長和脂質累積之影響性。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 24hr。
2. 以海水作為溶劑，分別改變濃度 (0 %、25 %、50 %、75 %、100 %)，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 48hr 。

3.6.1.5 添加幫助溶氧物質之影響

目的：探討在培養基中添加幫助溶氧物質 (介面活性劑、油酸、正己烷) 對菌體生長和脂質累積之影響。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 24hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。

3. 分別添加幫助溶氧物質（介面活性劑、油酸、正己烷）各 0.5 ml 於培養基中。
4. 再以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。

3.6.2 5 L 氣舉式批次發酵程序 (Fermentation Experiments)

3.6.2.1 不滅菌之影響

目的：探討不滅菌在不同 pH (pH 5.5、pH 4.0) 下，對於菌體生長、油脂累積的影響。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 24 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 5000 ml 培養基，且不進行滅菌程序。
3. 接種 10 % SM 於上述培養基中。
4. 固定通氣量為 1.5 vvm，再分別以不同初始 pH 值 (pH 5.5、pH 4.0)，並且以 2 N NaOH 控制其在初始 pH，及利用恆溫循環水槽控制溫度於 24 °C 等條件下進行培養。
5. 分別每 15 hr、9 hr 取樣一次。

3.6.2.2 兩階段培養

目的：探討不滅菌下，兩段式調控 pH 對菌體生長和油脂累積的影響性。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 24 hr。

2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 5000 ml 培養基，且不進行滅菌程序。
3. 接種 10 % SM 於上述培養基中。
4. 固定通氣量為 1.5 vvm，並設定初始 pH 4.0，於 48 hr 之後以 2 N NaOH 控制其 pH 5.5，及利用恆溫循環水槽控制溫度於 24 °C 等條件下進行培養。
5. 分別每 15 hr、9 hr 取樣一次。

3.6.2.3 在 90°C 下滅菌之影響

目的：探討滅菌溫度對菌體生長和脂質累積的影響

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 24 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 5000 ml 培養基，且裝進 5 L 血清瓶中利用加熱器密閉加熱至 90°C 持續 20 分鐘。
3. 接種 10 % SM 於上述培養基中。
4. 固定通氣量為 1.5 vvm，並且以 2 N NaOH 控制 pH 5.5，及利用恆溫循環水槽控制溫度於 24 °C 等條件下進行培養。
5. 分別每 15 hr、9 hr 取樣一次。

3.6.2.4 全海水培養基之影響

目的：探討將海水取代逆滲透 RO 水對菌體生長和脂質累積的影響。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 24 hr。

2. 以海水做為溶劑配製 5000 ml 培養基，並依照表 3-4 配製 5000 ml 培養基。
3. 接種 10 % SM 於上述培養基中。
4. 固定通氣量為 1.5 vvm，並且以 2 N NaOH 控制 pH 5.5，及利用恆溫循環水槽控制溫度於 24 °C 等條件下進行培養。
5. 分別每 15 hr、9 hr 取樣一次。

3.6.2.5 添加界面活性劑之影響

目的：探討界面活性劑 tween 80 對菌體濃度和脂質累積的影響性。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 24 hr。
2. 以逆滲透 RO 水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 5000 ml 培養基，且添加 0.5 % 的 tween 80。
3. 接種 10 % SM 於上述培養基中。
4. 固定通氣量為 1.5 vvm，並且以 2 N NaOH 控制 pH 5.5，及利用恆溫循環水槽控制溫度於 24 °C 等條件下進行培養。
5. 分別每 15 hr、9 hr 取樣一次。

3.6.3 50 L 氣舉式批次發酵程序 (Fermentation Experiments)

目的：探討海水培養基對於菌體生長速率、脂質累積速率之影響。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 24 hr。

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

3.6.4 100 L 氣舉式批次發酵程序 (Fermentation Experiments)

目的：探討 1.0 vvm 通氣量對於菌體生長速率、脂質累積速率之影響。

1. *R. glutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 24 hr。
2. 以全海水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 80 L 培養基。
3. 接種 1 % SM 於上述培養基中。
4. 固定通氣量 1.0 vvm，並且以 5 N NaOH 控制 pH 5.5，及利用恆溫循環水槽控制溫度於 24 °C 等條件下進行培養。
5. 分別每 15 hr、9 hr 取樣一次。

3.7 實驗裝置圖

本實驗所使用的培養裝置，包括搖瓶、5 L 氣舉式發酵槽、50 L 氣舉式發酵槽以及 100 L 氣舉式發酵槽。

3.7.1 搖瓶發酵培養裝置圖



圖 3-2 *Rhodotorula glutinis* 之搖瓶實驗裝置圖

3.7.2 5 L 氣舉式批次發酵培養裝置圖

本實驗所使用 5 L 氣舉式發酵槽，尺寸如圖 3-3，實際發酵體積為 5 L。

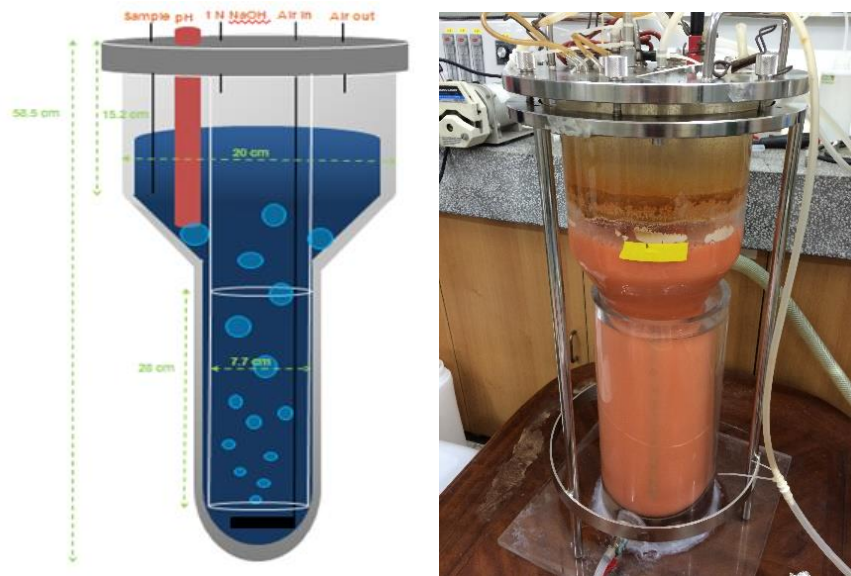


圖 3-3 5 L 氣舉式發酵槽裝置圖

3.7.3 50 L 氣舉式饋料發酵培養裝置圖

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



圖 3-4 50 L 氣舉式發酵槽裝置圖

3.7.4 100 L 氣舉式饋料發酵培養裝置圖

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



圖 3-5 100 L 氣舉式發酵槽裝置圖

第四章 結果與討論

4.1 不滅菌發酵程序

在發酵工程中，滅菌是一個必要而且無法避免的過程，因為如果發酵液中含有雜菌，將影響實驗中菌體的單一性也會間接影響產物的產量，以及日後分離純化的困難。雖然如此，但是滅菌的過程中，利用壓力以及高溫蒸汽，使槽體在短時間內升溫至 121°C 持續 20 分鐘，是一個會大量損耗能量和提高成本的過程，尤其隨著工業化的槽體放大，成本會因此大幅提升。本實驗中，利用紅酵母菌 *R. glutinis*，其可在酸性環境中成長的特性，使其他雜菌無法與其競爭，進而達到不滅菌以減少耗能降低成本的程序。

4.1.1 搖瓶批次發酵程序

4.1.1.1 滅菌並降低 pH 值影響

不同的微生物有其能適應的不同酸鹼值範圍，大部分細菌都能在中性環境下 pH 6 到 pH 8 之間生長，過酸或者過鹼都會影響酵素的活性，進而影響微生物的生長情形。根據前人研究，*R. glutinis* 的原培養條件是在 pH 5.5 的環境下生長為最適生長酸鹼值，此次實驗為達到不滅菌以降低成本且維持一定產量的目的，先在搖瓶實驗中滅菌並降低其環境酸鹼值，以找出 *R. glutinis* 可適用的環境 pH 值。

本實驗做降低酸鹼值的探討，分別在滅菌下用 pH 5.5（控制組）、pH 5.0、pH 4.5、pH 4.0、pH 3.0、pH 2.5、pH 2.0、pH 1.5，由圖 4-1 可知，*R. glutinis* 對酸性的耐受度為 pH 3.0，在更酸性的環境中已無法生長。實驗結果如圖 4-2，結果顯示在生物濃度上，控制組只與 pH 3.0 相差 2 g/L 差距較明顯之外，與其他幾組相距並不大，表示 *R. glutinis* 可在酸性的環境下生長，且不會大幅影響產量，

結果如表 4-1。

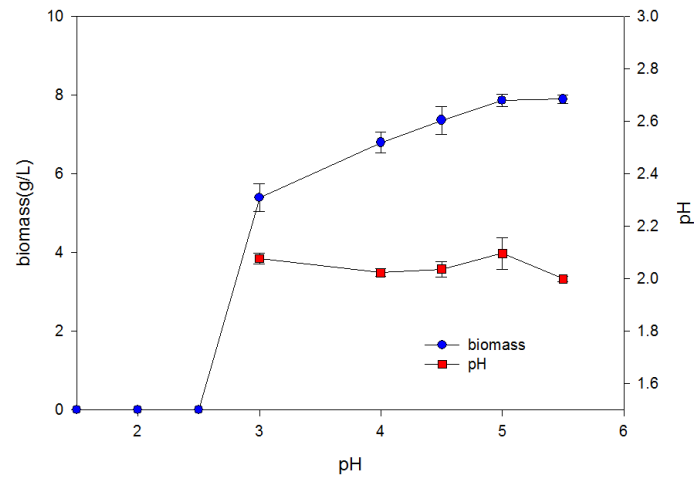


圖 4-1 在滅菌情形下，改變酸鹼值 (pH 1.5、pH 2.0、pH 2.5、pH 3.0、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.0、pH5.5) 培養 48 hr，探討對 *R. glutinis* 生長的影響性

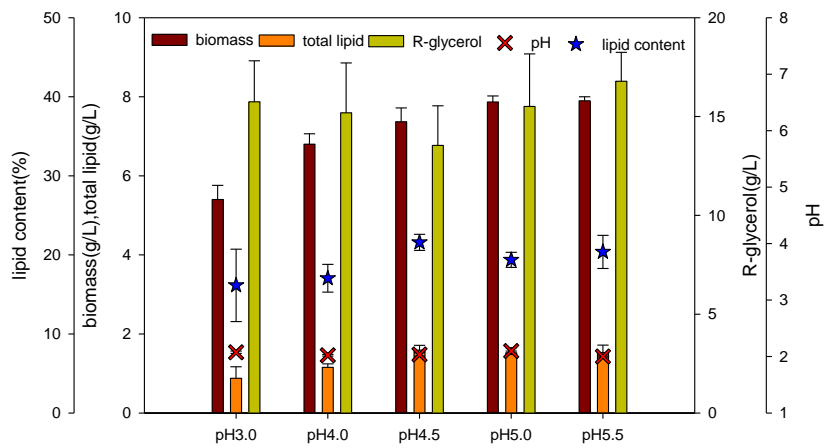


圖 4-2 在滅菌情形下，改變酸鹼值 (pH 3.0、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.0、pH 5.5) 培養 48 hr，探討對 *R. glutinis* 生長之影響 (培養基中剩餘甘油量表示為 R-glycerol)

表 4-1 在滅菌情形下，改變酸鹼值（pH 3.0、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.0、pH 5.5）培養 48 hr，探討對 *R. glutinis* 生長影響之實驗數據

pH	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)
3.0	2.1 ±0.02	5.4 ±0.4	16.2 ±4.6	0.9 ±0.3
4.0	2.0 ±0.02	6.8 ±0.3	17.1 ±1.8	1.2 ±0.1
4.5	2.2 ±0.03	7.4 ±0.4	21.6 ±1.0	1.6 ±0.1
5.0	2.1 ±0.06	7.9 ±0.2	19.4 ±1.0	1.5 ±0.1
5.5	2.0 ±0.01	7.9 ±0.1	20.4 ±2.1	1.5 ±0.2

4.1.1.2 不滅菌並降低 pH 值影響

在上述實驗中，在滅菌的情形下針對降低酸鹼值的實驗得知在 pH 3.0、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.0、pH 5.5 下，*R. glutinis* 可維持一定的生物產量以及油脂含量，所以接下來本實驗針對在完全不滅菌的情形下，降低酸鹼值對 *R. glutinis* 的生長影響性，並藉此決定出在放大槽體中，不滅菌的情況下所適用的 pH 值。

此次實驗選用 pH 3.0、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.5，由圖 4-3、表 4-2 實驗結果可以得知，其分別的生物濃度為 5.0 g/L、6.1 g/L、6.4 g/L、5.5 g/L，而最大油脂含量（=油脂重/菌體重）為 16.15 %、21.57 %、24.33 %、31.06 %，結果顯示在不滅菌的情況下，生物濃度與油脂都能維持一定的累積量，而且與有滅菌實驗結果差距不大。在放大到 5 L 的氣舉式發酵槽中，由於體積和通氣量的增加，也會直接的影響到培養基中染雜菌體的可能性，所以依據實驗的結果選擇 pH 4.0 的酸性環境來進行不滅菌的實驗，因其在搖瓶的結果中菌體濃度和油脂濃度不會與 pH 5.5 的結果相距過大。

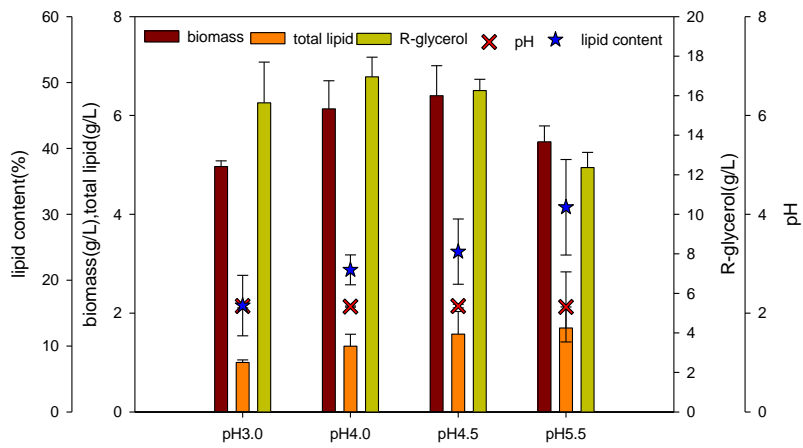


圖 4-3 在不滅菌情形下，改變酸鹼值（pH 3.0、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.5）培養 48 hr，探討對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-2 在不滅菌情形下，改變酸鹼值（pH 3.0、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.5）培養 48 hr，探討對 *R. glutinis* 生長影響之實驗數據

pH	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)
3.0	2.1 ± 0.04	5.0 ± 0.1	16.15 ± 4.6	1.0 ± 0.1
4.0	2.1 ± 0.01	6.1 ± 0.6	21.57 ± 2.3	1.3 ± 0.2
4.5	2.1 ± 0.04	6.4 ± 0.6	24.33 ± 5.0	1.6 ± 0.5
5.5	2.1 ± 0.71	5.5 ± 0.3	31.06 ± 2.1	1.7 ± 0.4

4.1.2 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序

為了能有效提升 *Rhodotorula glutinis* 產物之生產率，從搖瓶發酵放大培養至 5 L 氣舉式發酵槽內批次發酵，並改變其生長環境因子，做酸鹼值的改變，主要能在不滅菌的情形下，維持菌體生長速率且油脂累積速率，以達到降低生產成本的目的。

4.1.2.1 改變酸鹼值之影響性

在前述的搖瓶實驗中，可由結果得知 pH 4.0 為放大槽體中較適用的生長環境酸鹼值，所以在 5 L 的放大槽體實驗中，首先將培養基的起始 pH 值控制在 4.0，並以氫氧化鈉溶液持續控制酸鹼值在 4.0，且不滅菌培養至 159 hr 探討對 *R. glutinis* 的影響性。

實驗結果由圖 4-4 可得知，最大的菌體濃度可達到 12.5 g/L，而最大油脂累積濃度為 2.32 g/L，但由圖中可以看出最大油脂含量 (lipid content) 隨著時間而持續性的下降，由起初的 15 hr 時的含量 38.17 % 下降至 159 hr 時的含量 15.43 %，此結果可以看出酸鹼值的降低可以有效抑制雜菌的生長 (圖 4-6)，但卻會影響 *R. glutinis* 的油脂累積。由圖 4-5 將菌體濃度、最大油脂含量和控制組 (滅菌且 pH 5.5) 做比較，在最大菌體濃度上相差 5.0 g/L，酸鹼值的降低除了影響油脂累積會隨時間減少也影響了總體菌體濃度的生長。

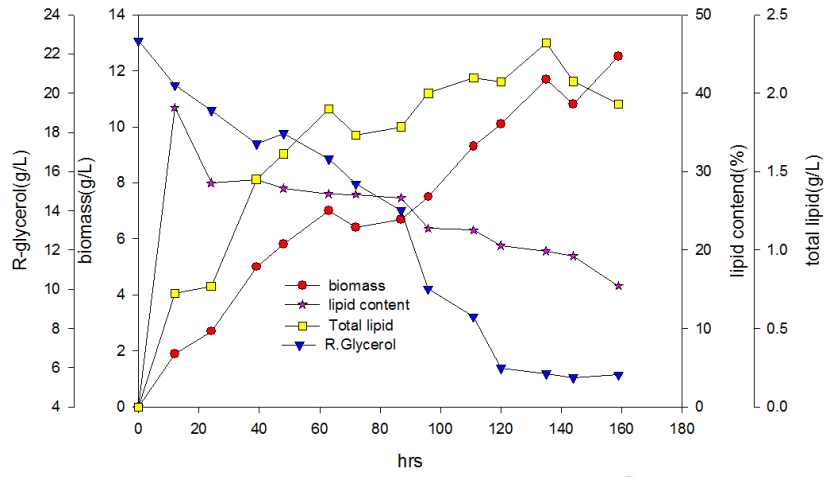


圖 4-4 改變培養基酸鹼值 (pH 4.0) 且不滅菌對 *R. glutinis* 的生長影響

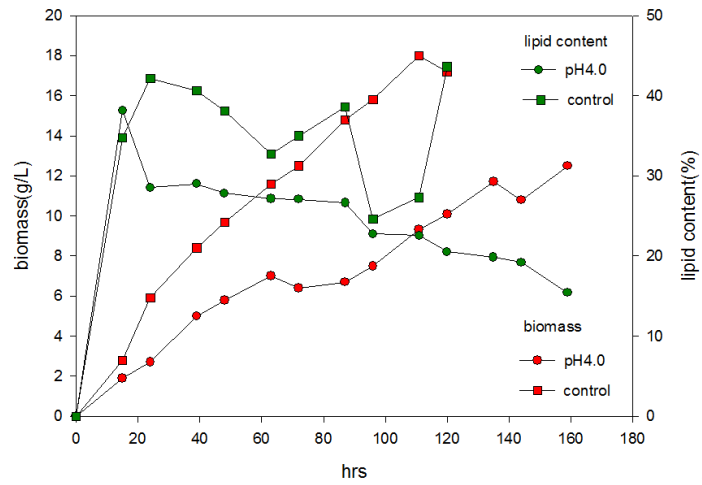


圖 4-5 pH 4.0 且不滅菌與控制組的菌體濃度和油脂累積率比較

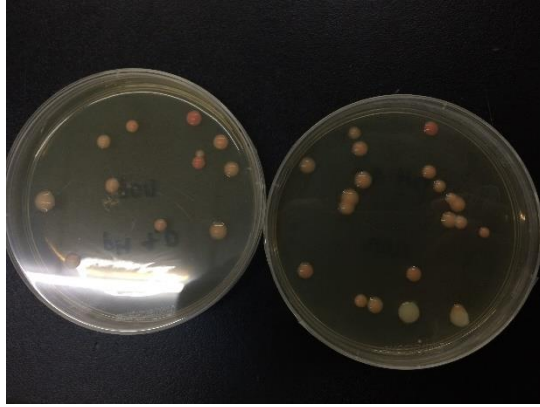


圖 4-6 pH 4.0 且不滅菌菌液稀釋 1000 倍在平板上之生長情形

由於上述實驗將培養基酸鹼值調整成 4.0 會影響 *R. glutinis* 的油脂累積，所以此實驗試將培養基之酸鹼值調回控制組所使用的 5.5 但不對槽體進行滅菌，持續培養 63 hr 並觀察對 *R. glutinis* 之生長影響。

從實驗結果圖 4-7 可觀察出 *R. glutinis* 的菌體濃度只能達到 4 g/L 左右就不再增長，碳源也有消耗完畢，且由圖 4-9 可明顯看出有雜菌的汙染，推斷培養基在 pH 5.5 下太接近中性酸鹼值 (pH 6.0~pH 8.0) 且無對其進行滅菌，有利於多數微生物和細菌生長，以至於 *R. glutinis* 在培養基中存在競爭者，使其無法有效增加菌體濃度。

前述的兩個實驗中，(1) 培養基環境為 pH 4.0 時，*R. glutinis* 的油脂累積率會隨時間持續下降，無法維持穩定的含量；(2) 培養基環境為 pH 5.5 時，無法有效抑制雜菌，且 *R. glutinis* 的菌體濃度為控制組的 1/4 (圖 4-8)，都無法在不滅菌但降低培養酸鹼值的情形下接近控制組的 *R. glutinis* 生長情形。

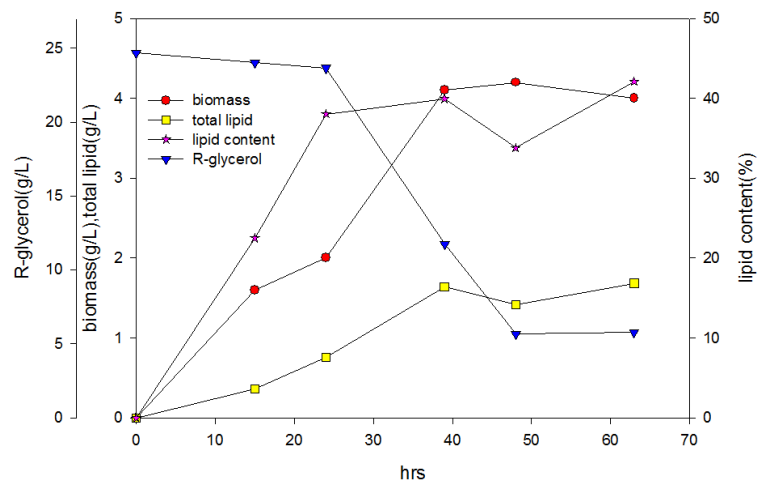


圖 4-7 培養基酸鹼值 (pH 5.5) 且不滅菌對 *R. glutinis* 的生長影響

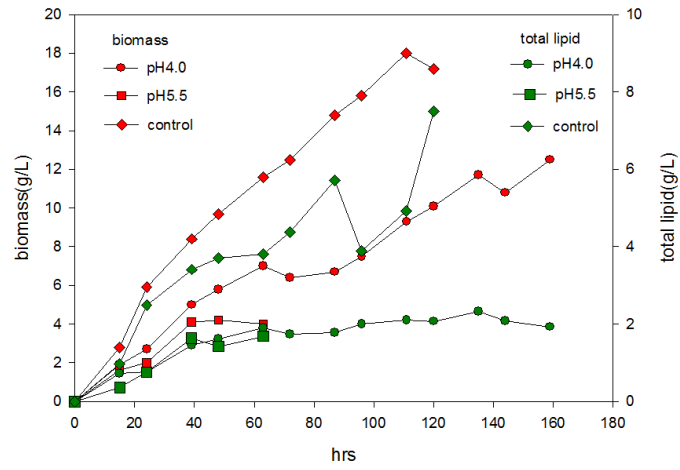


圖 4-8 pH 5.5 且不滅菌與控制組的菌體濃度和油脂累積濃度比較



圖 4-9 pH 5.5 且不滅菌菌液稀釋 1000 倍在平板上之生長情形

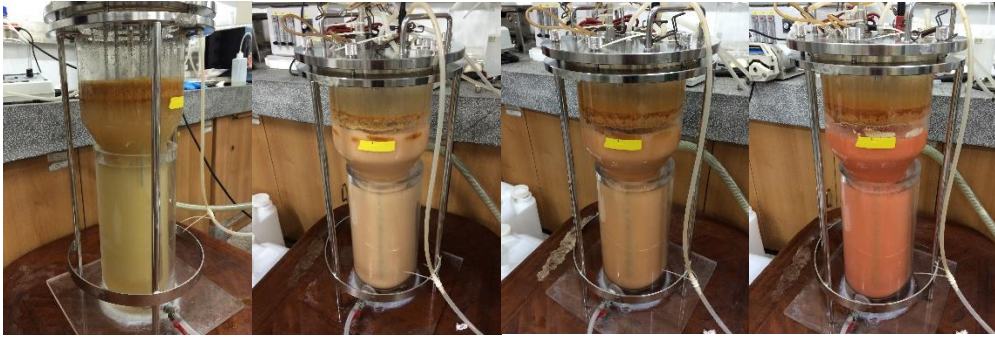


圖 4-10 5 L 氣舉式發酵槽，*R. glutinis* 在 pH 4.0 且不滅菌下培養 159 hr 之變化情形



圖 4-11 5 L 氣舉式發酵槽，*R. glutinis* 在 pH 5.5 且不滅菌下培養 63 hr 之變化情形

4.1.2.2 兩階段控制酸鹼值之影響

為了改善前述實驗中關於雜菌孳生、油脂含量隨時間減少等問題，此次實驗在不滅菌的情形下，將起始的培養基酸鹼值控制為 4.0，以防雜菌的孳生，但為解決油脂累積的問題，參考前述實驗 pH 4.0 時的 *R. glutinis* 菌體濃度，選在持續培養 48 hr 後，將培養基酸鹼值改控制為 5.5，使其油脂累積能不受 pH 值的影響能隨時間持續累積。

如圖 4-12 實驗結果，在 48 hr 以前 pH 為 4.0，*R. glutinis* 之菌體濃度達到 6 g/L，提升 pH 為 5.5 後濃度持續提升至 11.7 g/L，在最大油脂含量也可達到 61.32%，明顯的改變了 pH 4.0 時無法累積油脂的問題。但此次實驗若和控制組進行比較，如圖 4-13，在 *R. glutinis* 的濃度表現上相差了 6 g/L，另一方面在最大油脂濃度相距了 1 g/L。這樣的結果並不符合起初的預期，因為在菌體濃度上相距甚多，推測在 pH 4.0 時酸性的影響甚大，對於 *R. glutinis* 是一個較不佳的環境，影響到其生成菌體的效率，相對於二級代謝物的油脂影響也更顯著。

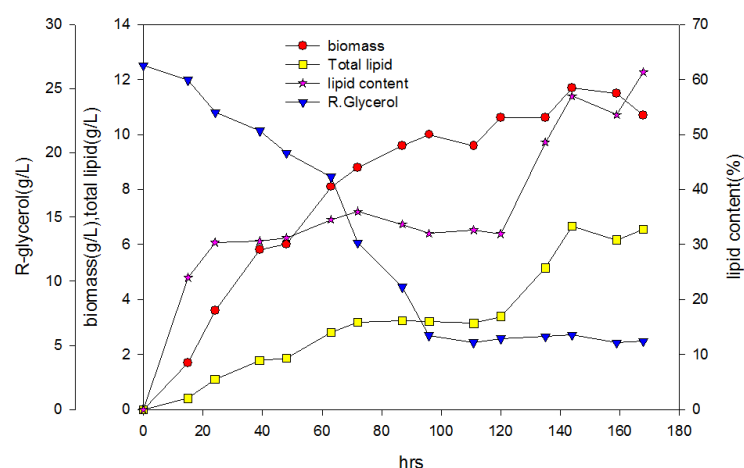


圖 4-12 兩階段控制酸鹼值 (pH 4.0 到 pH 5.5) 且不滅菌對 *R. glutinis* 的生長影響

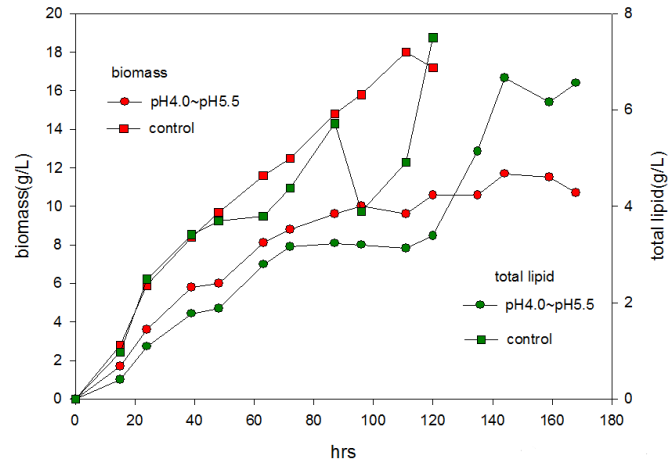


圖 4-13 兩階段控制酸鹼值且不滅菌與控制組的菌體濃度和油脂累積濃度比較



圖 4-14 5 L 氣舉式發酵槽，*R. glutinis* 在兩階段控制酸鹼值且不滅菌下培養 168 hr 之變化情形

4.1.2.3 在 90°C 下滅菌之影響性

此次實驗原本的目的是希望能在不滅菌的情形下維持菌體一定量的濃度和油脂累積，但在前述的兩階段式控制酸鹼值實驗中，發現結果仍然與控制組相差不少，判斷利用降低 pH 值而達到不滅菌的情況似乎較不可行。不過，為達到降低在發酵過程中的生產成本，本實驗試將一般滅菌的溫度 121°C 降至 90°C 並且維持原本的酸鹼值 pH 5.5，探討其對 *R. glutinis* 生長的影響性。

實驗結果如圖 4-15，*R. glutinis* 的濃度可達到 12.70 g/L，而最大油脂含量 36%，最大油脂濃度為 3.91 g/L，由圖 4-17 可知槽體經過 90°C 的滅菌並沒有受到雜菌的污染，但是從數據中可看出油脂的累積上是偏低的，推測可能是因為 90 °C 滅菌的環境下，只能延遲雜菌污染的時間，對於 *R. glutinis* 在生長上仍必須與雜菌競爭，進而影響了油脂的累積。若和控制組進行比較，如圖 4-16，在最高菌體濃度上相差 6.3 g/L，在最高油脂濃度也相差了 3.6 g/L 之多，但相較於兩階段控制酸鹼值卻縮短了生長週期的時間，從 168 hr 到 111 hr。

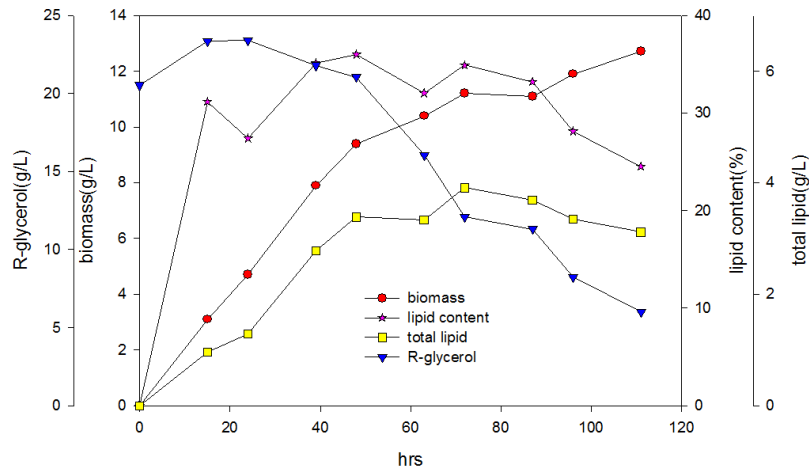


圖 4-15 在 90°C 下滅菌對 *R. glutinis* 的生長影響

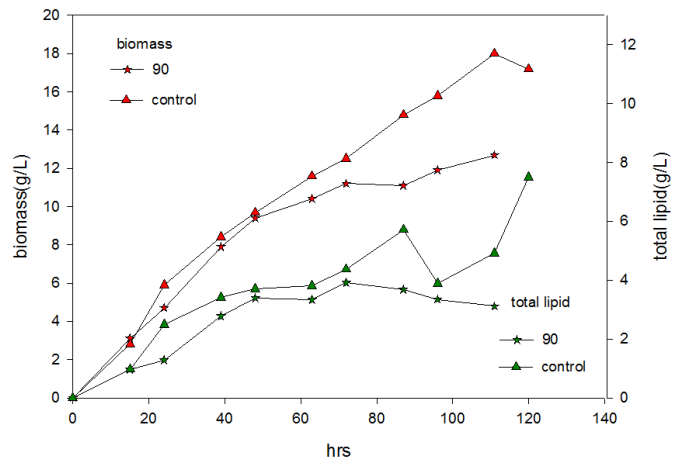


圖 4-16 在 90°C 下滅菌與控制組的菌體濃度和油脂累積濃度比較

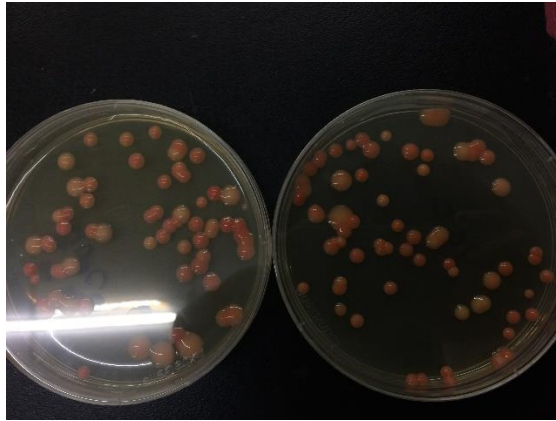


圖 4-17 在 90°C 下滅菌菌液稀釋 1000 倍在平板上之生長情形

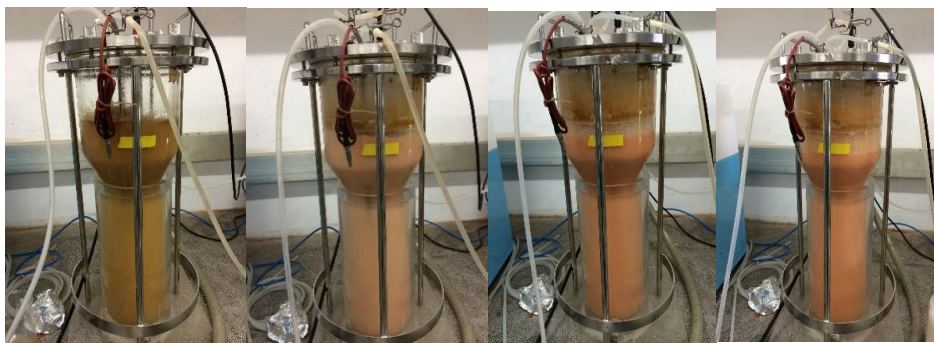


圖 4-18 5 L 氣舉式發酵槽，*R. glutinis* 在 90°C 下滅菌下培養 111 hr 之變化情形

4.1.3 5 L 氣舉式發酵槽綜合探討

在 5 L 氣舉式發酵槽中，前述實驗探討著降低生產成本為目的，利用以降低酸鹼值且不滅菌進行一連串對 *R. glutinis* 之菌體生長量和油脂累積含量的影響性。經由整理如表 4-3，首先，如圖 4-19 以菌體生長量和菌體生長速率來看，pH 5.5 且 90°C 滅菌的情況為最佳，最大菌體量可達 11.7 g/L，速率為 0.11 g/L/h，但與控制組 (pH 5.5 且 121°C) 滅菌結果，最大菌體量達 18.0 g/L，速率為 0.16 g/L/h，相差甚多，而 pH 4.0 且完全不滅菌下，雖然不會增生雜菌，且最大菌體生長量達 12.5 g/L，但生長速率只有 0.08 g/L/h。

再來，油脂累積含量部分如圖 4-20，pH 4.0 且不滅菌的條件下，油脂含量會隨著時間持續下降，酸性環境下明顯地影響了油脂的累積，進而使油脂累積速率偏低；兩階段是培養和 90°C 滅菌其平均油脂含量分別為 38.37 %、31.37 % 結果相近，在累積速率方面也與控制組相同。

就此次實驗結果顯示不滅菌與 90°C 滅菌下，*R. glutinis* 仍可持續增長其菌體量，且 pH 值的下降能有效抑制雜菌生長，但相對的也明顯地影響到 *R. glutinis* 的菌體生長情形，而且也影響著二級代謝物的生成，造成產量下降且菌體量也下降的情形，雖然此種做法可以降低生產成本，但因為嚴重地影響了產物生成，判斷此方法在未來的商業化生產較無可行性。

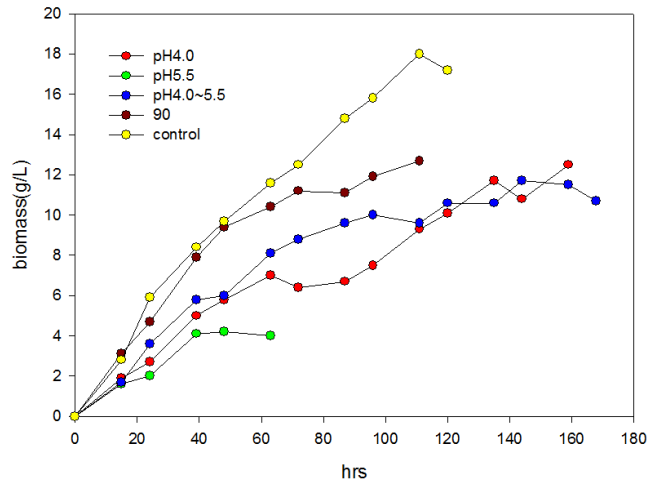


圖 4-19 不滅菌程序中，對 *R. glutinis* 菌體濃度之影響性

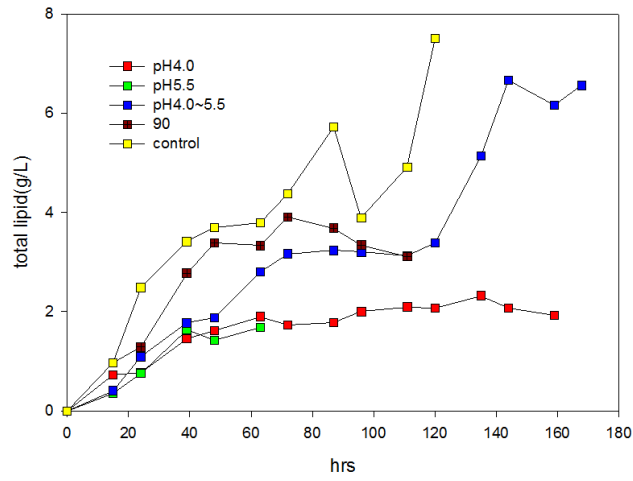


圖 4-20 不滅菌程序中，對 *R. glutinis* 油脂濃度之影響性

表 4-3 對於累積油脂比較，各發酵槽實驗之動力學參數整理

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Average. lipid content (% w/w)	Max. lipid productivity (g/L/h)
pH 4.0 non-sterile	12.5	0.08	38.17	18.2 ± 2	0.02
pH 5.5 non-sterile	4.2	0.09	42.10	38.6 ± 4	0.03
pH4.0~pH5.5 non-sterile	11.7	0.08	61.32	57.3 ± 4	0.05
pH 5.5 sterile on 90°C	12.7	0.11	36.00	28.6 ± 4	0.05
pH 5.5 sterile	18.0	0.16	43.61	35.5 ± 12	0.06

4.2 海水培養基發酵程序

自 1970 年代起，由於國際感受到石化能源逐漸枯竭且溫室效應日益嚴重，開始推行乾淨的替代能源，其中生質柴油就是其中之一倡導的核心。各國為因應推行生質柴油，並開始制定政策推行，廣泛的種植含高油脂價值的作物，大豆、玉米等，但是台灣四面環海、地狹人稠，無法擁有大面積的土地進行耕種，本實驗利用富含高油脂累積的 *R. glutinis*，並且利用海水當作培養基，以利減少民生用水資源的消耗，又可達到累積油脂利用於生產生質柴油的優點。

4.2.1 搖瓶批次發酵程序

4.2.1.1 鹽度之影響

利用海水進行酵母菌的培養，首要遇到的問題就是鹽度。海水是經由雨水沖刷岩石以及溶解大氣中的二氧化碳等因而富含許多礦物質，其中以氯離子與鈉離子含量最多，且海水鹽度約為 3.5 % (National Oceanographic Data Center)，故本實驗探討氯化鈉 (NaCl) 對 *Rhodotorula glutinis* 生長之影響性，分別利用五種鹽度 0.1 (控制組)、10、20、30、40 g/L。實驗結果如圖 4-21 及表 4-4，結果顯示在氯化鈉在濃度 0.1 g/L 時能得到最高的菌體濃度 6.73 g/L，但隨著氯化鈉濃度提升至 40 g/L，其菌體濃度隨之下降至 4.93 g/L；在油脂累積的部分，其含量分別為 18.3 %、16.7 %、15.3 %、14.4 %、14.7 %，由此能發現鹽度濃度過高會抑制菌體生長及油脂的累積，然而 *R. glutinis* 能在 40 g/L 的氯化鈉濃度下繼續生長，可得知菌體具有一定的耐鹽程度，推測 *R. glutinis* 在海水中進行培養是具有可行性的。

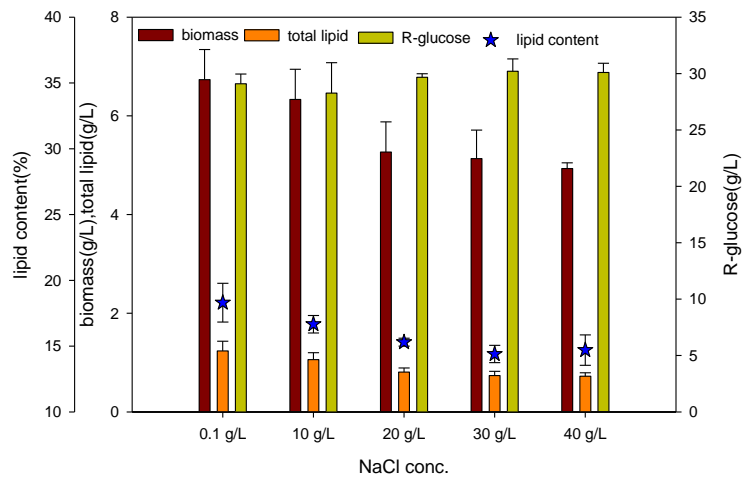


圖 4-21 改變鹽度(0.1、10、20、30、40 g/L)培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-4 改變鹽度(0.1、10、20、30、40 g/L)培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

NaCl conc. (g/L)	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)
0.1	2.0 ± 0.05	6.7 ± 0.6	18.3 ± 1.5	1.2 ± 0.2
10	1.9 ± 0.06	6.3 ± 0.6	16.7 ± 0.7	1.1 ± 0.1
20	2.0 ± 0.01	5.3 ± 0.6	15.3 ± 0.3	0.8 ± 0.1
30	2.0 ± 0.01	5.1 ± 0.6	14.4 ± 0.7	0.7 ± 0.1
40	2.0 ± 0.02	4.9 ± 0.1	14.7 ± 1.2	0.7 ± 0.1

4.2.1.2 不同海水比例之影響

在前述實驗中，已確定 *R. glutinis* 可以耐受濃度達 40 g/L 的環境，所以接著進行不同比例的海水測試，本次實驗所用的是西部沿海的海水，和實驗室的一次 RO 水進行比例的混合，分別是 0 % (控制組)、25 %、50 %、75 %、100 %，如圖 4-22、表 4-5，*R. glutinis* 菌體濃度依序為 9.20、8.23、7.17、6.25、8.55 g/L，可觀察出將純海水做為培養基菌體濃度表現上可和用純水的控制組相當，不受海水高鹽度和各式微量元素的影響。而在油脂累積的部分，全海水的使用也不影響 *R. glutinis* 的油脂生成，考慮成本的因素，若能單純的使用全海水將能把培養基成本降到最低，所以後續放大實驗便以純海水進行 *Rhodotorula glutinis* 的培養影響性探討。

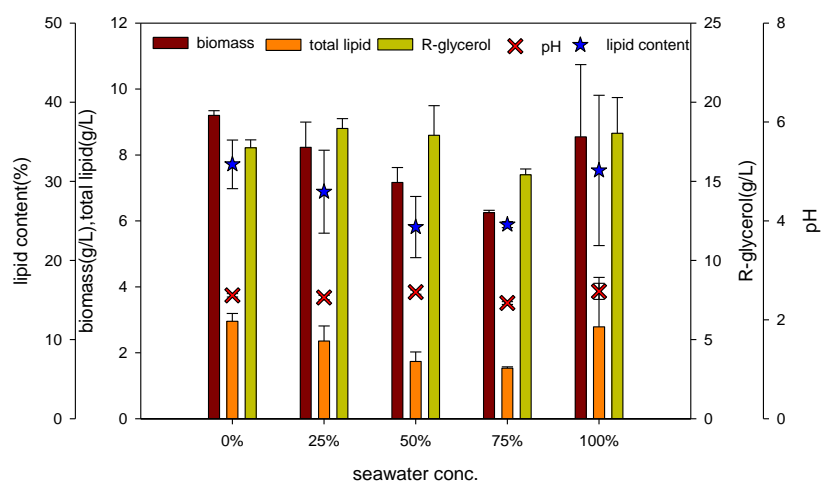


圖 4-22 改變海水濃度(0、25、50、75、100 %)培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-5 改變海水濃度(0、25、50、75、100 %)培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

Seawater (%)	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)
0	2.5 ±0.04	9.2 ±0.1	32.2 ±3.1	3.0 ±0.2
25	2.5 ±0.04	8.2 ±0.8	28.7 ±5.3	2.4 ±0.5
50	2.6 ±0.04	7.2 ±0.5	24.2 ±3.9	1.7 ±0.3
75	2.3 ±0.03	6.3 ±0.1	24.5 ±0.4	1.5 ±0.04
100	2.6 ±0.16	8.6 ±2.2	31.4 ±9.5	2.8 ±1.5

4.2.2 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序

4.2.2.1 海水培養基之影響性

在搖瓶實驗中，已經得知使用全海水的可行性。為了進一步探討海水於工業發酵製程中，於是進行在 5 L 氣舉式發酵槽批次培養之影響的研究。在通氣量 1.5 vvm、溫度 24°C、pH 5.5 條件下，將培養基用純海水取代 RO 水，探討海水培養基對 *Rhodotorula glutinis* 生長的影響性。

本次實驗利用全海水取代 RO 水培養持續 183 hr，由圖 4-23 的數據可觀察到 *R. glutinis* 的菌體濃度可達 15.9 g/L，而最大油脂含量可達 81.77%，由文獻指出 (Bhosale.,2001) 海水中的礦物質有利於提升油脂的累積，結果相符，由圖 4-24 將控制組（使用 RO 水且 pH 5.5）與全海水的菌體濃度和油脂含量進行比較，可觀察出在最大油脂含量方面，全海水可比控制組出 38.16%；但如圖 4-24 及表 4-6，在 *R. glutinis* 最大菌體濃度方面，控制組卻比海水多出 2.1 g/L，推測在高鹽度的環境下，*R. glutinis* 菌體會面臨高滲透壓的問題如圖 4-25，因此影響了菌體的生長。但是就整體而言，海水對 *Rhodotorula glutinis* 在菌體濃度或者油脂累積方面的影響性是與控制組相差無幾的，但同時在利用海水方面又可達到降低成本的目的，所以在利用海水發酵培養 *R. glutinis* 是可行的。

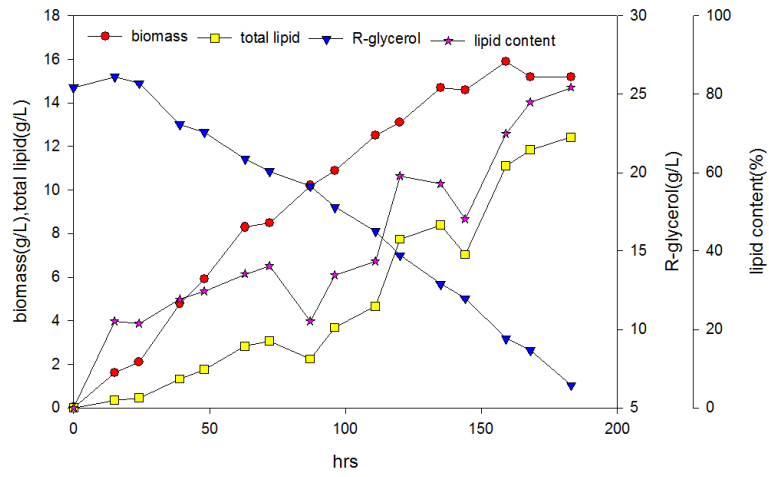


圖 4-23 在全海水培養基下對 *R. glutinis* 的生長影響

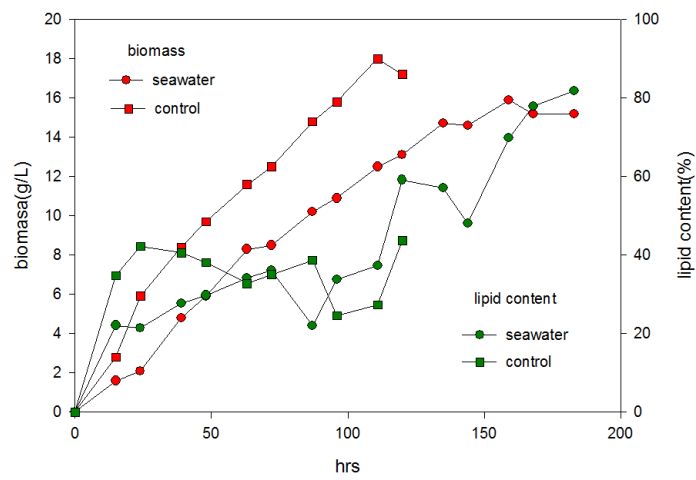


圖 4-24 在全海水培養基與控制組的菌體濃度和油脂累積含量比較

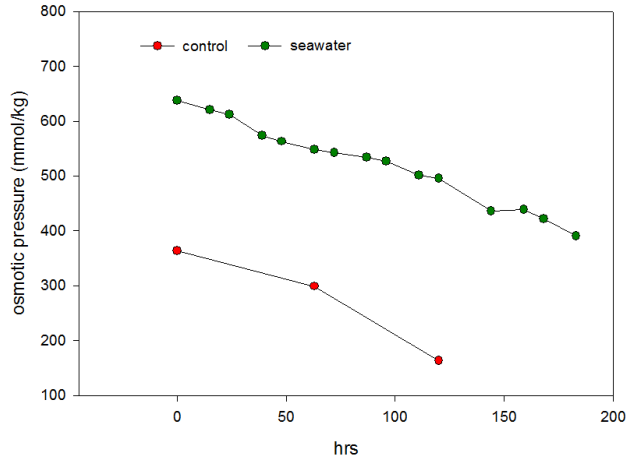


圖 4-25 在 5L 氣舉式發酵槽，全海水培養基與控制組的滲透壓比較

表 4-6 在 5 L 氣舉式發酵槽，全海水和控制組（RO 水）培養基，對 *R. glutinis* 生長之影響

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Average. lipid content (% w/w)	Max. lipid productivity (g/L/h)
Seawater	15.9	0.10	81.77	76.5 ± 6	0.07
Control	18.0	0.16	43.61	35.5 ± 12	0.06



圖 4-26 5 L 氣舉式發酵槽，*R. glutinis* 在全海水培養基下培養 183 hr 之變化情形

4.2.3 50 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序

4.2.3.1 海水培養基之影響性

在上述實驗中，在 5 L 氣舉式發酵槽中利用全海水培養 *Rhodotorula glutinis* 是具有可行性的。為了能更有效率的提高菌體濃度、油脂累積含量，本實驗利用 50 L 氣舉式發酵槽在通氣量 1.5 vvm 下進行 *Rhodotorula glutinis* 之放大培養並探討其影響性。

實驗結果可由圖 4-27、表 4-7 得知，利用 50 L 全海水培養 *R. glutinis* 的菌體濃度可達 22.5 g/L，而最大油脂含量為 39.60%，由此可知再放大槽體到 50 L 的情形下，*Rhodotorula glutinis* 仍可維持穩定的生長情形。若與控制組（使用 RO 水）進行比較，在菌體濃度方面，由圖 4-28 可觀察出，無論是最大菌體濃度或者是最大油脂含量都是相近的，由此可知在 50 L 的槽體中用海水來取代 RO 水是可行，而且菌體產量和油脂濃度是不會受到影響的。若再由滲透壓方面來探討的話，如圖 4-29 顯示出，雖然利用海水的環境滲透壓會高出利用純水的滲透壓，但是從油脂和菌體的表現上，可推測 *R. glutinis* 具有調節本身滲透壓的能力，使其生長可不受到高滲透壓環境的影響。

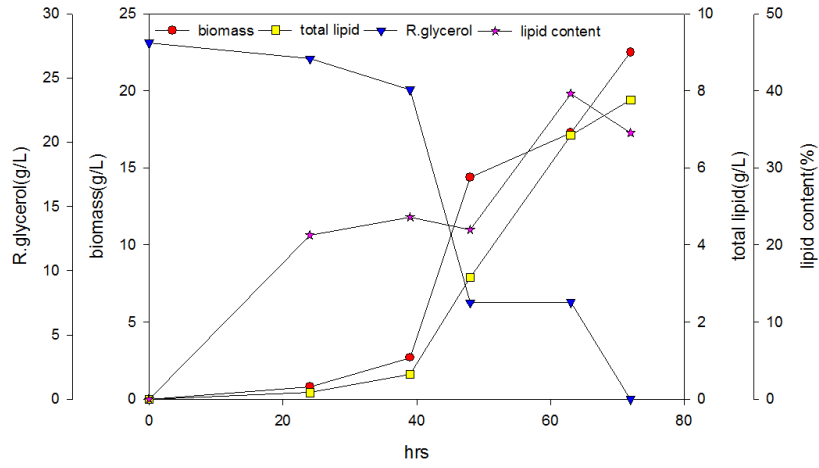


圖 4-27 在全海水培養基下對 *R. glutinis* 的生長影響

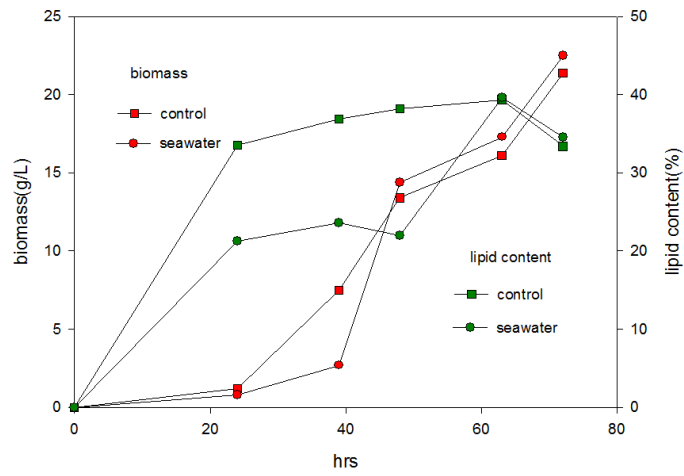


圖 4-28 在全海水培養基與控制組的菌體濃度和油脂累積含量比較

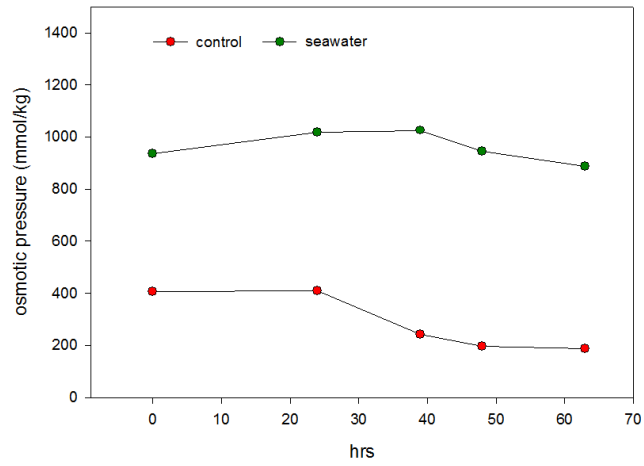


圖 4-29 在 50 L 氣舉式發酵槽，在全海水培養基與控制組的滲透壓比較

表 4-7 在 50 L 氣舉式發酵槽，全海水和控制組（RO 水）培養基，對 *R. glutinis* 生長之影響

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Average. lipid content (% w/w)	Max. lipid productivity (g/L/h)
Seawater	22.5	0.31	39.60	37.1 ± 4	0.12
Control	21.4	0.30	39.37	36.4 ± 4	0.10

4.2.4 海水培養基之成本影響性

在前述實驗中，已證實海水替換成純水是可行的，而且在 *Rhodotorula glutinis* 的菌體和油脂量表現上皆可比擬使用 RO 水之控制組，接下來需要探討的即是替換成海水後，成本上的差異。

在實驗室中，一般自來水經由 RO 水機製作成 RO 水，需要經過五道濾心，分別是初段溝槽濾芯、前置活性碳濾芯、CTO 濾芯、RO 膜、後置活性碳濾芯，分別需要在各二個月、三個月、三個月、一年、一年做更換。本篇章利用翔順儀器有限公司的陳正麒先生所提供分別以大陸製、東南亞製、台灣製、美國製的濾芯價格做成本上的探討。如表 4-8 所示。以台灣為例，當自來水通過五道濾芯廢水與 RO 水的比例約為 6：4，而濾膜 1 小時可以製作出 10 公升的 RO 水，一年可製作的水量為 87600 公升，而這樣製作的 RO 水量會需要 219000 公升的自來水，台灣目前自來水價 1000 公升為 9.45 元（每月用量達 10 度以上），一年約為 2070 元，再加上濾芯一年份需花費約 1884 元，一年花費於製造 RO 水為 3954 元，一公升的 RO 水約為 0.05 元，以工業上用水而言此成本並不高，但在製水的過程中將會耗費一半以上的自來水，尤其台灣水資源缺乏加上地形環境不易蓄水，將會造成大量水資源的浪費，將會是生產過程的隱憂。

表 4-8 各地區（大陸、東南亞、台灣、美國）RO 水機所使用之價格

	初段溝槽濾 芯	前置活性碳 濾芯	CTO 濾芯	RO 膜	後置活性碳 濾芯
大陸	34	42	32	300	180
東南亞	30	48	36	600	204
台灣	42	66	42	900	300
美國	84	132	96	1080	456

4.3 添加幫助溶氧物質之發酵程序

由於本次實驗目的是希望能藉由黏紅酵母菌可累積高油脂的特性，來解決生質柴油料源的問題，所以為了能在氣舉式發酵槽中，有效的提升 *Rhodotorula glutinis* 的菌體量以及油脂含量，本實驗根據文獻(Xu et al., 2014)的參考，嘗試在培養基中添加能幫助溶氧之物質(oxygen vector)，探討其對 *Rhodotorula glutinis* 之影響性。

4.3.1 搖瓶批次發酵程序

4.3.1.1 添加物質之影響

本實驗為了能有效增加溶氧，選用了界面活性劑 tween 80、油酸、正己烷三種物質，個別添加 1% 於搖瓶中進行培養，探討其對 *Rhodotorula glutinis* 的影響性。實驗結果如圖 4-30 及表 4-9，在菌體濃度方面，使用界面活性劑可達 9.0 g/L 相比於控制組高出 0.4 g/L，而使用油酸為 8.1 g/L 與控制組相距並不多，但使用正己烷效果並不佳，只能達到 6.3 g/L。另外在油脂含量部分，除了正己烷含量為 13.41% 偏低外，界面活性劑和油酸的表現都與控制組相差無幾，但就綜合表現來說，界面活性劑還是略優於油酸，所以選擇界面活性劑 tween 80 做添加濃度的測試。

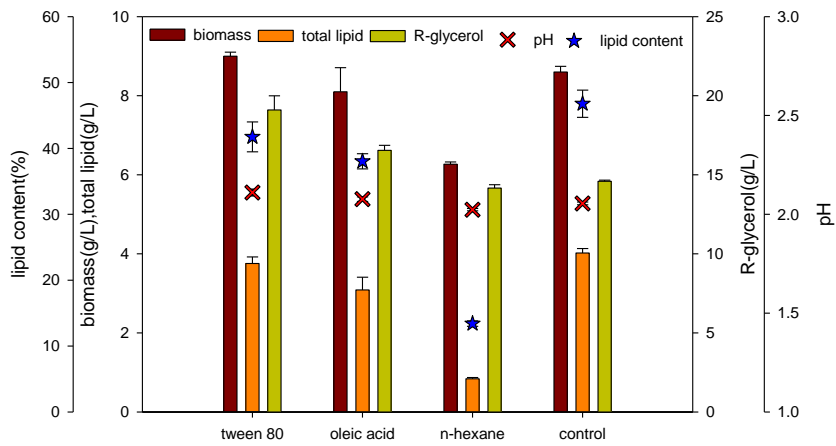


圖 4-30 添加幫助溶氧物質 (tween 80、oleic acid、n-hexane、control)培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-9 添加幫助溶氧物質 (tween 80、oleic acid、n-hexane、control)培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

Oxygen vector	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)
Tween 80	2.1 ± 0.02	9.0 ± 0.1	41.8 ± 2.3	3.8 ± 0.2
Oleic acid	2.1 ± 0.01	8.1 ± 0.6	38.0 ± 1.2	3.1 ± 0.3
n-hexane	2.0 ± 0.01	6.3 ± 0.1	13.4 ± 0.4	0.8 ± 0.03
control	2.1 ± 0.01	8.6 ± 0.1	46.8 ± 2.1	4.0 ± 0.1

4.3.1.2 添加界面活性劑之影響

上述實驗中，在界面活性劑 tween 80、油酸、正己烷中，選擇了在菌體濃度和油脂累積上較佳的界面活性劑 tween 80，並在本次實驗中進行添加量對 *Rhodotorula glutinis* 之影響性探討。

界面活性劑的添加量分別為 0 g/L (控制組)、5 g/L、10 g/L、20 g/L，其實驗結果如圖 4-31 及表 4-10，*R. glutinis* 的菌體濃度分別為 6.20 g/L、9.45 g/L、8.80 g/L、8.85 g/L，由此可觀察出，添加界面活性劑能均能使菌體濃度高出控制組 2.6 g/L 至 3.25 g/L 之多，顯示能有效增加菌體濃度，但並無隨著添加的含量增加而增加。至於油脂含量部分，無論有無添加均表現在 30 % 至 40 %，並無明顯的影響。由此可知，添加界面活性劑能增加菌體濃度，但增加添加量並無顯著影響，所以為考量成本，選擇添加量 5 g/L 繼續作放大培養。

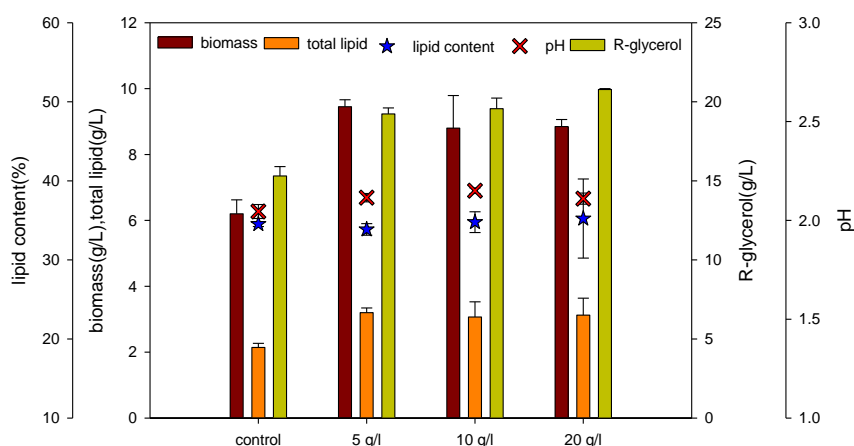


圖 4-31 添加界面活性劑 (0 g/L、5 g/L、10 g/L、20 g/L) 培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-10 添加界面活性劑 (0 g/L、5 g/L、10 g/L、20 g/L) 培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

Tween 80 conc.	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)
5 g/L	2.1 ±0.02	9.5 ±0.2	33.9 ±0.7	3.2 ±0.1
10 g/L	2.2 ±0.01	8.8 ±1.0	34.8 ±1.3	3.1 ±0.5
20 g/L	2.1 ±0.03	8.9 ±0.2	35.2 ±5.0	3.1 ±0.5
control	2.1 ±0.04	6.2 ±0.4	34.5 ±0.3	2.1 ±0.1

4.3.2 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序

4.3.2.1 添加界面活性劑之影響

上述實驗利用搖瓶批次發酵，在培養基中添加界面活性劑 tween 80 5 g/L 培養 *Rhodotorula glutinis* 得到較佳的菌體濃度表現，於是本研究將其結果進行放大，到 5 L 氣舉式發酵槽中在 1.5 vvm 通氣量下添加 5 g/L 之界面活性劑並探討其對 *R. glutinis* 之影響性。

由圖 4-32 可得知，在 5 L 氣舉式發酵槽中培養持續 159 hr，*R. glutinis* 的菌體濃度可達 18.1 g/L，最大油脂含量為 88.76 g/L，在油脂表現方面式較為突出的，與控制組進行比較，如圖 4-33 及表 4-11，在菌體濃度上與控制組結果相近；而油脂方面，添加界面活性劑的最大油脂濃度可達 15.98 g/L，但若也將培養時間成本同時考慮，控制組與添加界面活性劑的結果相近，可能在放大槽體中，添加了 5 g/L 的濃度並無法有效提升溶氧量，所以 *R. glutinis* 在菌體濃度和油脂含量並無如預期有顯著的提升。

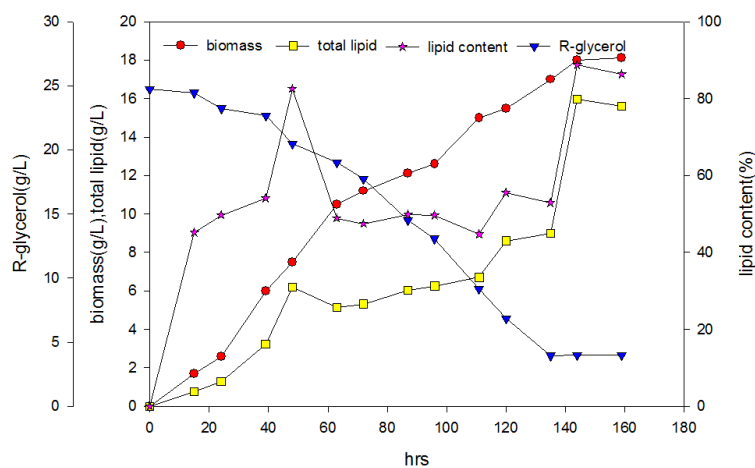


圖 4-32 添加界面活性劑 5 g/L 對 *R. glutinis* 的生長影響

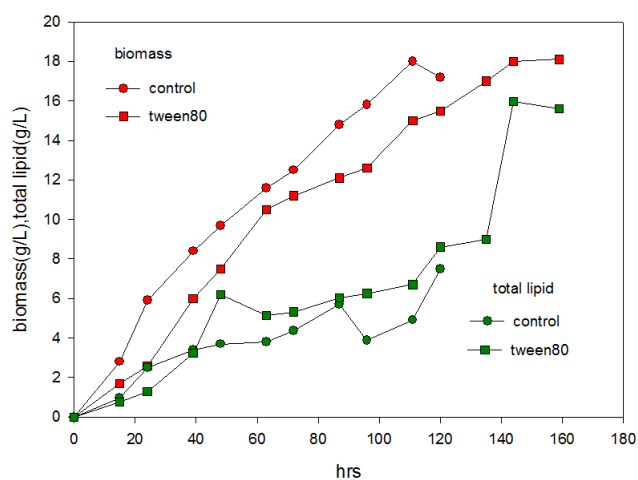


圖 4-33 添加界面活性劑 5 g/L 與控制組的菌體濃度和油脂累積含量比較

表 4-11 添加界面活性劑 5 g/L 對 *R. glutinis* 的生長影響

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Average. lipid content (% w/w)	Max. lipid productivity (g/L/h)
Add to tween 80 5 g/L	18.1	0.11	88.76	87.5 ± 2	0.10
Control	18.0	0.16	43.61	35.5 ± 12	0.06



圖 4-34 5 L 氣舉式發酵槽，*R. glutinis* 在添加界面活性劑 5 g/L 下培養 159 hr 之變化情形

4.3.3 體積溶氧係數 k_La

由於上述實驗中，添加界面活性劑 tween 80 後，並無如預期中的增加 *R. glutinis* 的菌體濃度，故本實驗使用 5 L 氣舉式發酵槽作為生物反應器並利用動態溶氧的實驗方法來探討添加界面活性劑 tween 80 不同濃度(0 g/L、5 g/L、10 g/L、15 g/L)和體積溶氧係數變化的關係。實驗結果如圖 4-35，結果顯示添加量在 5 g/L 時，其溶氧係數和未添加 tween 80 是相近的，符合前述實驗結果；但將界面活性劑之添加量提升到 10 g/L，溶氧係數將會提升至 4.41 min^{-1} ，及達到飽和量，若再將添加量提升到 15 g/L，溶氧係數會降至 2.76 min^{-1} 。但由於界面活性劑 tween 80 在加至 10 g/L 後，會在槽體中易大量起泡，所以不利於培養 *R. glutinis*。

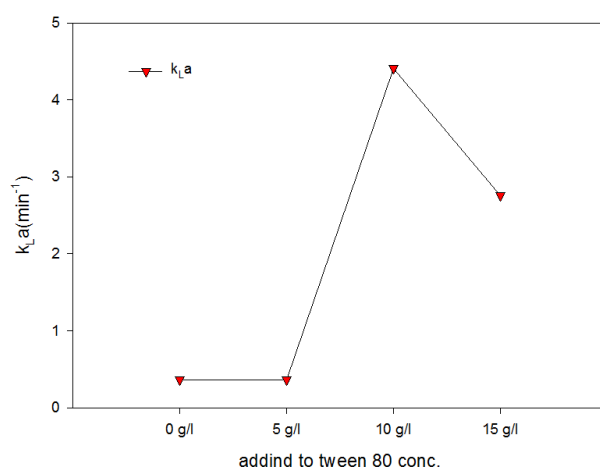


圖 4-35 利用動態溶氧方法測試不同界面活性劑添加量 (0 g/L、5 g/L、10 g/L、15 g/L) 並探討對 *R. glutinis* 生長影響性

4.4 100 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序

為了能將 *Rhodotorula glutinis* 的發酵程序應用於工業上，並且增加其生長速率，於是利用 100 L 氣舉式發酵槽進行培養，探討其對 *Rhodotorula glutinis* 生長的影響性。如圖 4-36 及表 4-12，在 1 vvm 的通氣量下培養 63 hr，*R. glutinis* 的最大菌體濃度可達到 20.7 g/L，而最大油脂含量為 37.53%，最大菌體濃度則為 7.77 g/L。此結果表示，*R. glutinis* 可在大型槽體 100 L 中達到穩定的產量，後續可在此槽體中探討更多不同發酵策略。

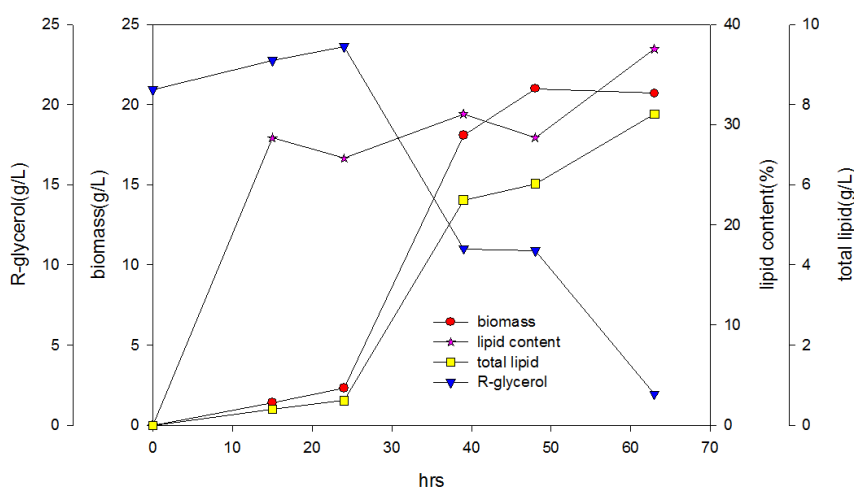


圖 4-36 在 100 L 氣舉式發酵槽中培養對 *R. glutinis* 的生長影響

表 4-12 在 100 L 氣舉式發酵槽中培養對 *R. glutinis* 的生長影響

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Average. lipid content (% w/w)	Max. lipid productivity (g/L/h)
1 vvm	20.7	0.33	37.53	33.1 ± 6	0.12

4.5 海水培養基與添加界面活性劑及 100 L 之氣舉式生物反應器之綜合探討

將前面所述之 (1) 5 L、50 L 氣舉式發酵槽利用海水培養基、(2) 5 L 氣舉式發酵槽中添加界面活性劑、(3) 100 L 氣舉式發酵槽以 1 vvm 通氣量培養，這三大部分作油脂上的探討，結果如表 4-13。首先在菌體濃度和菌體生長速率方面，在 5 L 氣舉式發酵槽中，海水培養基的表現雖然略低於一般使用純水，但在 50 L 中卻與使用純水相近，由於使用海水能降低生產成本和減少水資源的利用，所以此實驗應該具有未來可行性的；而在 5 L 中添加幫助溶氧的界面活性劑 tween 80 5 g/L 和未添加的控制組做比較並無增加菌體生長速率上的幫助，添加 5 g/L 在幫助溶氧的效果有限，連帶的無法增加 *R. glutinis* 的菌體生長；至於 100 L 在菌體生長速率上有穩定表現。

累積油脂部分，在最大油脂生產速率方面，5 L 發酵槽中添加界面活性劑 tween 80 效果較佳，它的添加未能增加菌體的生長，但卻有效的增加了整體油脂累積，推想其可能抑制了菌體生長而增加了油脂累積的速率；而海水培養基方面，與純水的油脂累積量相近，無明顯變化。

表 4-13 對於累積油脂比較，各發酵槽實驗之動力學參數整理

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Avg. lipid content (%)	Max. total lipid (g/L)	Yield* (Y _{x/s} ,g/g)	Max. lipid productivity (g/L/hr)
Batch- 5 L (Seawater)	15.9	0.10	76.5 ± 6	12.43	0.65	0.07
Batch-5 L (Pure water,)	18.0	0.16	35.5 ± 12	7.50	0.37	0.06
Batch-5 L (Pure water, tween 80 5 g/L)	18.1	0.11	87.5 ± 2	15.98	0.77	0.10
Batch- 50 L (Seawater)	22.5	0.31	37.1 ± 4	7.77	0.28	0.12
Batch- 50 L (Pure water)	21.4	0.30	36.4 ± 4	7.15	0.34	0.10
Batch- 100 L (Pure water)	20.7	0.33	33.1 ± 6	7.77	0.41	0.12

*Y_{x/s}= lipid produced/substrate consumed

表 4-14 累積油脂之發酵槽實驗與文獻之比較

Fermentation strategy feeding volume	Carbon source	Aeration	Max. biomass (g/L)	Avg. lipid content (%)	Max. total lipid (g/L)	Yield ($Y_{X/S}$, g/g)	Max. lipid productivity (g/L/hr)	Reference
Fed-batch 5 L stirred tank	Glucose	-----	86.2	25.0	11.3	0.29	0.14	(Zhang et al., 2014)
Batch 5 L airlift	Glucose and xylose	-----	15.1	36.4 ± 1	5.5	0.13	0.09	(Liu et al., 2014)
Fed-batch 2 L stirred tank	Glycerol	2 vvm	10.1	60.7	6.10	0.03	0.09	(Cheirsilp et al., 2011)
Batch 5 L airlift	Rice bran enzymatic hydrolysate and crude glycerol	2 vvm	22.0	42.5 ± 2	9.4	0.16	0.10	(張容慈, 2014)
Batch 5 L airlift	Crude glycerol	2 vvm	25.4	49.5 ± 8	16.8	0.52	0.21	(劉懿嫻, 2014)
Batch-5 L	Crude glycerol	1.5 vvm, tween 80 5 g/L	18.1	87.5 ± 2	16.0	0.77	0.10	This study
Batch- 50 L	Crude glycerol	1.5 vvm, Seawater	22.5	37.1 ± 4	7.8	0.28	0.12	This study
Batch- 100 L	Crude glycerol	1.0 vvm	20.7	33.1 ± 6	7.8	0.41	0.12	This study

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

本研究利用 *Rhodotorula glutinis* 培養，分成三大部分進行討論：(1) 改變酸鹼值且不滅菌，(2) 全海水培養基取代純水，(3) 添加幫助溶氧物質界面活性劑 tween 80，分別探討對 *R. glutinis* 的生長影響性，以下整理列出幾點結論：

1. 酸鹼值的改變 (pH 5.5、pH 4.0、pH 4.0~pH 5.5) 且不滅菌下，在降低 pH 的過程中，雖然會降低雜菌的滋生，但是會直接的影響油脂含量，造成油脂含量持續降低，不利於油脂累積。且雖然不滅菌可以降低成本，但是在菌體濃度上，也同時造成顯著的影響，所以降低 pH 且不滅菌是較不可行的方法。
2. 降低滅菌溫度 (90°C)，雖然可以降低成本的損耗，但是依然在菌體濃度上表現不佳，*R. glutinis* 在滅菌不完全下，需要與雜菌競爭，間接影響了菌體量和油脂累積的表現，雖然 *R. glutinis* 對環境適應力強但依然難不受影響。
3. 海水培養基取代純水，其無論在 5 L 或 50 L 的氣舉式發酵槽中，都可達到與純水相近的菌體生長量和油脂累積量，且可降低發酵成本和節省水資源。
4. 添加界面活性劑 tween 80，可以增加槽體本身的溶氧量，卻無法有效的增生菌體濃度，但同時增加了油脂累積量，所以 tween 80 的添加抑制了菌體生長但提昇了菌體累積濃度。
5. 100 L 氣舉式發酵槽在 1 vvm 通氣量，可以有穩定的菌體生長量和油脂含量。

5.2 未來展望

對於 *Rhodotorula glutinis* 此株酵母菌體在發酵過程方面，已有全面性的發展，若能繼續研究在海水中培養後，萃取油脂轉化成生質柴油的分離純化問題以及使轉脂化後的生質柴油能穩定品質，並針對其餘海水中微量元素和鹽度對菌體的影響性作探討，必定能使其可行性更向前邁進。另一方面，*R. glutinis* 其具有另一項高單價產物-類胡蘿蔔素，也具有研究之潛力。

參考文獻

- 余依環(2012)。以工業廢棄物粗甘油與酒糟水做為培養基探討 *Rhodotorula glutinis* 的生長影響。東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。
- 劉懿嫻(2014)。以粗乾油作為碳源探討利用氣舉式發酵槽培養 *Rhodotorula glutinis* 生產 β -胡蘿蔔素及微生物油脂之可行性。東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。
- 張容慈(2014)。探討以纖維水解液與粗甘油作為碳源對於高油脂 *Rhodotorula glutinis* 之生長影響性。東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。
- 許惠美(2010)。生質柴油規範及測試方法的評估。國立台北科技大學化學工程研究所碩士論文。
- 馮昌宇(2009)。*Rhodobacter sphaeroides* 好氧發酵生成 Co-Q₁₀ 之發酵槽饋料批次策略探討。東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。
- 莊晟榜(2002)。Tween 系列界面活性劑對微生物降解碳氫化合物之影響。中原大學化學工程學系研究所碩士論文。
- A.I.Galaction, D.Cascaval., T.Marius., F.Elena. (2005). Enhancement of oxygen mass transfer instirred bioreactors using oxygen-vectors. *Propionibacterium shermanii* broths, *Bioproc.Biosyst.Eng.*27263–271.
- Anne B., Kay V., Ronja T., Janina P., Daniel V., Nicole F.D., Reinhard F. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome fpha represses sexual development in the red lipt. *Current Biology*, 15:1833-1838.
- Borkovich K.A., Alex LA., Yarden O., Freitag M., Turner GE.,Read ND. et al. (2004). Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68:100-108
- Chen-You Li, Chu-Yuan Cheng, Teh-Liang Chen. (2001). Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, 29:258-263
- C. Ratledge. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single

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

- Danesi E.D.G., Rangel-Yagui C.O., Carvalho J.C.M., Sato S. (2004). Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 26:329-335
- Easterling, E. R., W. T. French, R. Hernandez and M. Licha (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour Technol* 100(1): 356-361.
- Eda Cü elik, Nalan Ozbay, Nuray Oktar and P. C. alik (2008). Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47: 2985-2990.
- Venkata Subhash G., Venkata Mohan S.. (2011). Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Asperillus sp.* Using corncob waste liquor as a substrate. *Bioresource Technology*, 102:9286-9290
- Huang, C., X. F. Chen, L. Xiong, X. D. Chen, L. L. Ma and Y. Chen. (2013). Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. *Biotechnol Adv* 31(2): 129-139.
- J.D. McMillan, D.I. Wang. (1987). Enhanced oxygen transfer using oil-in-water dispersions. *Ann. NY Acad. Sci.* 569–582.
- Justin Montanti, Nhuan P. Nghiem and David B. Johnston. (2011). Production of Astaxanthin from Cellulosic Biomass Sugars by Mutants of the Yeast *Phaffia rhodozyma*. *Appl Biochem Biotechnol* 164:655–665
- Johnson, V., M. Singh, V. S. Saini, V. R. Sista and N. K. Yadav. (1992). Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World J Microbiol Biotechnol* 8(4): 382-384.
- John Wright., Angela Colling. (1995). Chapter 3 - Salinity in the oceans Seawater: *its Composition, Properties and Behaviour (Second Edition)*, Pages 29-38
- Li, Y., Z. Zhao and F. Bai (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology* 41(3): 312-317.
- Malisorn, C. and W. Suntornsuk (2008). Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource*

Technology 99(7): 2281-2287.

- Malisorn, C. and W. Suntornsuk (2009). Improved β -carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. *Biochemical Engineering Journal* 43(1): 27-32.
- Matelli, H. L., I. M. da Silva, N. O. Souza and D. Pomeroy (1990). Production of β -carotene by a *Rhodotorula* strain grown on sugar cane juice. *Biotechnology Letters* 12(3): 207-208.
- Maria Ana L.R.M. Cortes, Carla C.C.R. de Carvalho. (2014). Effect of carbon sources on lipid accumulation in *Rhodococcus* cells. *Biochemical Engineering Journal* 94 (2015) 100–105
- Meng, X., J. Yang, X. Xu, L. Zhang, Q. Nie and M. Xian (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy* 34(1): 1-5.
- Ming-Hua Liang a, Jian-Guo Jiang. (2013). Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in Lipid Research* 52 (2013) 395–408
- Oh, B. R., J. W. Seo, S. Y. Heo, W. K. Hong, L. H. Luo, M. H. Joe, D. H. Park and C. H. Kim (2011). Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain. *Bioresour Technol* 102(4): 3918-3922.
- Prakash Bhosale, R.V. Gadre (2000). Production of β -carotene by a *Rhodotorula glutinis* mutant in seawater medium. *Bioresource Technology* 76 (2001) 53±55
- Saenge, C., B. Cheirsilp, T. T. Suksaroge and T. Bourtoom. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry* 46(1): 210-218.
- Thompson, J. C. and B. B. He (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production. *Applied Engineering in Agriculture* 22: 261-265.
- Umesh Narta, Sudesh Roy, Shamsheer S. Kanwar, Wamik Azmi. (2010). Improved production of L-asparaginase by *Bacillus brevis* cultivated in the presence of oxygen-vectors. *Bioresource Technology* 102 (2011) 2083–2085
- Yating Liu, Yanping Wang, Hongjuan Liu, Jian'an Zhang. (2014). Enhanced lipid production with undetoxified corncob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis*

using a high cell density culture strategy. *Bioresource Technology* 180 (2015) 32–39

Yoon, S. H. and J. S. Rhee. (1983). Lipid from yeast fermentation: Effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*. *JOACS* 60(7): 1281-1286.

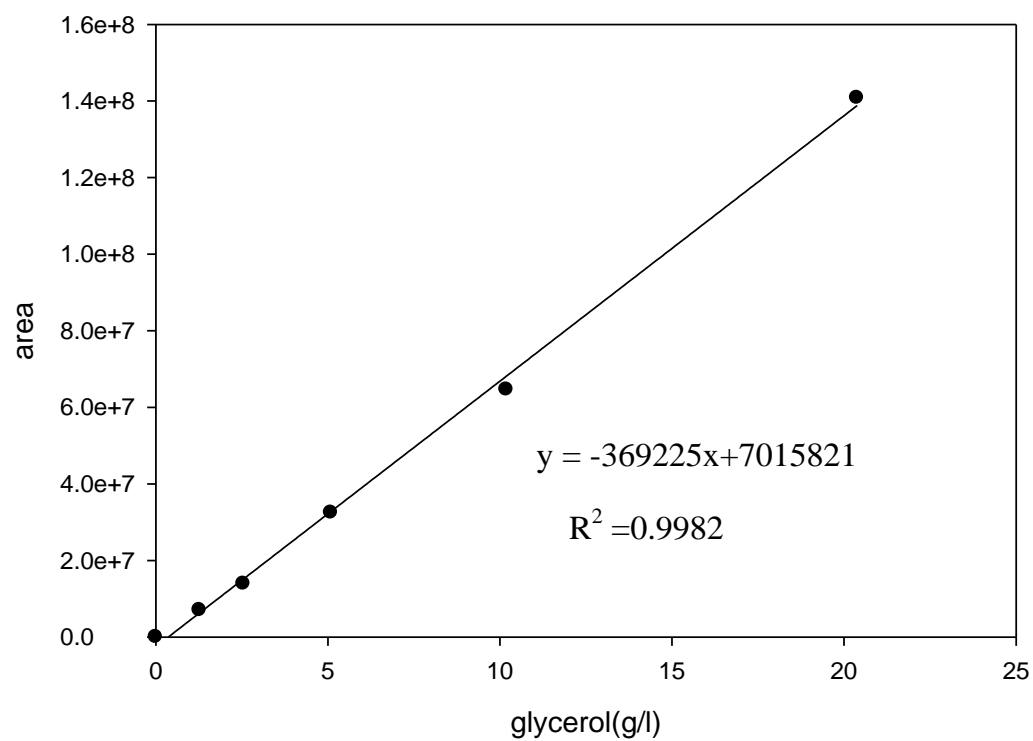
Zahoor Ullah, Mohamad Azmi Bustam, Zakaria Man. (2014). Biodiesel production from waste cooking oil by acidic ionic liquid as a catalyst. *Renewable Energy* 77 (2015) 521e526

Zhaoxian Xua, FangfangBoa, JunXiaa, ZhuzhenSuna, ShaLi, XiaohaiFeng, Hong Xu. (2014). Effects of oxygen-vectors on the synthesis of epsilon-poly-lysine and the metabolic characterization of *Streptomyces albulus* PD-1. *Biochemical Engineering Journal* 94 (2015) 58–64

Zhiping Zhang, Xu Zhang, Tianwei Tan. (2014). Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. *Bioresource Technology* 157 149-153

附錄

甘油檢量線



Glycerol 標準檢量線方程式：

$$\text{Glycerol conc.} = (\text{Peak area} - 7015821) / -369225$$

作者簡歷

姓名：廖于婷 (Yu Ting Liao)

籍貫：台灣省台中市

出生年月日：1992/02/07

學歷：東海大學化學工程與材料工程研究所



教育背景	學校	科(系)別	畢業日期
高中	國立豐原高中	普通科	民國 99 年 6 月
大學	東海大學	化學工程與材料工程 學系	民國 103 年 6 月
研究所	東海大學	化學工程與材料工程 研究所	民國 104 年 7 月

經歷：

東海大學化學工程與材料工程系所助教

2014 第三屆綠色永續生物技術研討會

2015 第四屆綠色永續生物技術研討會

2015 BEST 生物技術暨生物工程研討會

論文發表：

Yen, H. W., & Liao, Y. T. (廖于婷) (2015). The cultivation of oleaginous *Rhodotorula mucilaginosa* in an airlift bioreactor by using seawater. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Accepted.



2012/09/17 實驗室成員於司馬庫斯合影

生命中有很多事都是如此
享受過程中的不易與等待慢慢會變成一種愉悅
辛苦的播種必然歡呼的收割

雖然這次很不巧的遇上了下雨
但我們還是都完成了很辛苦的一次登山健行
期待大家都能有很不一樣的體會

謝謝所有人的參與與努力

-顏宏偉老師