

東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏宏偉 博士

Advisor：Hong-Wei Yen, Ph. D.

探討以纖維水解液與粗甘油作為碳源對於高油脂酵母菌

-*Rhodotorula glutinis* 之生長影響性

The fermentation process development of *Rhodotorula glutinis*
by using lignocellulosic biomass hydrolysate and crude glycerol

研究生：張容慈 撰

Graduate student：Jung-Tzu Chang

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

碩士學位論文指導教授推薦書

化學工程與材料工程研究所 張容慈 君所提供之論文

探討以纖維水解液與粗甘油作為碳源對於高油脂酵母菌-Rhodotorula glutinis 之生長影響性

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

化學工程與材料工程研究所所長

指導教授：



日期：103 年 7 月 11 日

碩士學位論文口試委員會審定書

化學工程與材料工程研究所 張容慈 君所提供之論文
探討以纖維水解液與粗甘油作為碳源對於高油脂酵母菌-Rhodotorula glutinis 之生長影響性

經本委員會審定通過，特此證明。

論文口試委員會

委員：

張嘉竹
劉永全
張嘉鳴

魏銘元
楊芳傑

指導教授：

張嘉鳴

中華民國 107 年 7 月 11 日

中文摘要

Rhodotorula glutinis(BCRC 22360) 為一株具有累積高脂質含量之油脂性酵母菌，由於細胞生長速度快，可達到高密度細胞培養，且油脂成分類似於植物油，因此具有相當高發展潛力，可作為生質柴油生產之替代性油料的來源。本研究主要探討利用水解農業廢棄物及粗甘油對 *R.glutinis* 生長及累積油脂的影響，進而提高整體油脂生產速率。

由於生產生質柴油技術之土地利用和成本過高等影響，以微生物油脂作為生質柴油的原料的利用已逐漸取代傳統植物油，而利用水解木質纖維素生物質量作為培養 *R.glutinis* 的碳源，其原因為木質纖維素生物質量用來生產生物燃料最豐富的原料之一，此種做法可以解決土地利用和成本過高的問題，並可達到廢棄物再利用的永續生產目的。

在固定各種碳源（葡萄糖、純甘油、粗甘油、木糖及水解木質纖維素）濃度為 30 g/l 之搖瓶實驗中，由水解木質纖維素作為碳源其菌體濃度可達到 9.47 ± 0.23 g/l，油脂濃度為 10.7 ± 0.63 %，雖然油脂含量較於其他碳源產量低，但可以得到較高的 β -胡蘿蔔素含量為 2.74 ± 0.3 mg/g。在進行探討碳源影響之 5 L 發酵槽實驗中，固定碳源濃度 60 g/l 進氣量在 2 vvm 下，利用水解木質纖維素和粗甘油作為混合碳源，以提升生物油脂之產量，其生物油脂最高含量以添加粗甘油的混合碳源之實驗可達到 51.8 ± 2.08 %，為使用水解木質纖維素的 1.51 倍。由實驗結果可知，利用水解木質纖維素做為碳源培養產油酵母菌具有相當良好的可行性，低成本的農產品廢棄物發酵作為生質柴油進料在未來也極具相當的發展潛力。

關鍵字：*Rhodotorula glutinis*、微生物油脂、水解、 β -胡蘿蔔素

ABSTRACT

Rhodotorula glutinis (BCRC 22360) is an oleaginous yeast that can accumulate copious quantities of lipids. 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. The hydrolysis of agricultural wastes and crude glycerol was adopted to enhance the growth of *R. glutinis* for the accumulation of microbial oil in the study.

The argument of land usage and the cost consideration had turned the use of microbial lipids in replace of vegetable oils into a competitive alternative for the production of biodiesel fuel. And lignocellulosic biomass is one of the most abundantly available raw material on the Earth for the production of biofuels. Therefore, the development of *R. glutinis* for the utilization of lignocellulosic biomass hydrolysate as carbon source is desirable. This method can solve the problem for the high cost and land usage, in addition, it can achieve the resources recovery.

In flask batch experiments, several carbon sources (glucose, pure glycerol, crude glycerol, xylose, lignocellulosic biomass hydrolysate) at 30 g/l were evaluated. The lignocellulosic hydrolysate can lead to the biomass of 9.47 ± 0.23 g/l and lipid content of 10.7 ± 0.63 % measured. Although the lipid content is lower than others, it has the higher β -carotene content of 2.74 ± 0.3 mg/g. The mixture lignocellulosic biomass hydrolysate and crude glycerol as a carbon source for the cultivation of *R. glutinis* in an airlift bioreactor was also evaluated, and obtained the highest lipid content of 51.8 ± 2.08 % at a 2 vvm aeration rate with 30 g reducing sugars/L of lignocellulosic biomass hydrolysate and 30 g/l crude glycerol. The lipid content in the batch with mixture carbon source is 1.51 times the batch using sole lignocellulosic

biomass hydrolysate at 60 g reducing sugars/L. Conclusively, it is useable by using lignocellulosic biomass hydrolysate as a carbon source for the cultivation of *R. glutinis*. This low cost feedstock has the potential being applied for microbial oils production in the future.

Keywords : *Rhodotorula glutinis*, Microbial oil, Hydrolysate, β -carotene



謝誌

從大學專題到研究所這段時間，遇到很多不同的事情，不管是喜或悲，真的感謝很多人對我的提攜與幫助，首先誠摯的感謝指導教授顏宏偉老師，在研究這領域的敦敦教誨與指導，指點我研究實驗的正確方向，啟發我獨立思考與解決問題的能力，並適時地予以鼓勵，使我在求學生涯中受益匪淺，在此謹致上由衷的謝意；在做人處事方面，在研究生生活難免會遭遇許多困難，但老師總是給我許多的意見和鼓勵，讓我往後在遇到各種狀況都有良好的應變能力。同時感謝東海化工所楊芳鏘教授、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，於口試期間所給予的指導與寶貴的建議，才使得本論文更增充實，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、西瓜的指導與照顧，也感謝同學詠琳、姿錦、毛毛、小孟、B文、奕全、阿凱的互相扶持與勉勵，以及感謝學弟妹于婷、品姣、車車、國智、昭翰、奕偉、俊星等，在我求學過程中增加許多歡笑，有很多不同的回憶，在大家的陪同下，覺得研究特別有意義。另外感謝在我求學生涯中曾經給予我協助的老師以及同學，感謝有你們讓我的生活更多采多姿。最後，謹將此論文獻給我的父母親及家人，感謝他們無盡的付出，以及在精神上的支持與鼓勵，才可以讓我在求學階段無後顧之憂地進行研究，謝謝你們！並再次感謝曾經幫助我的所有人。

2014年7月28日

目錄

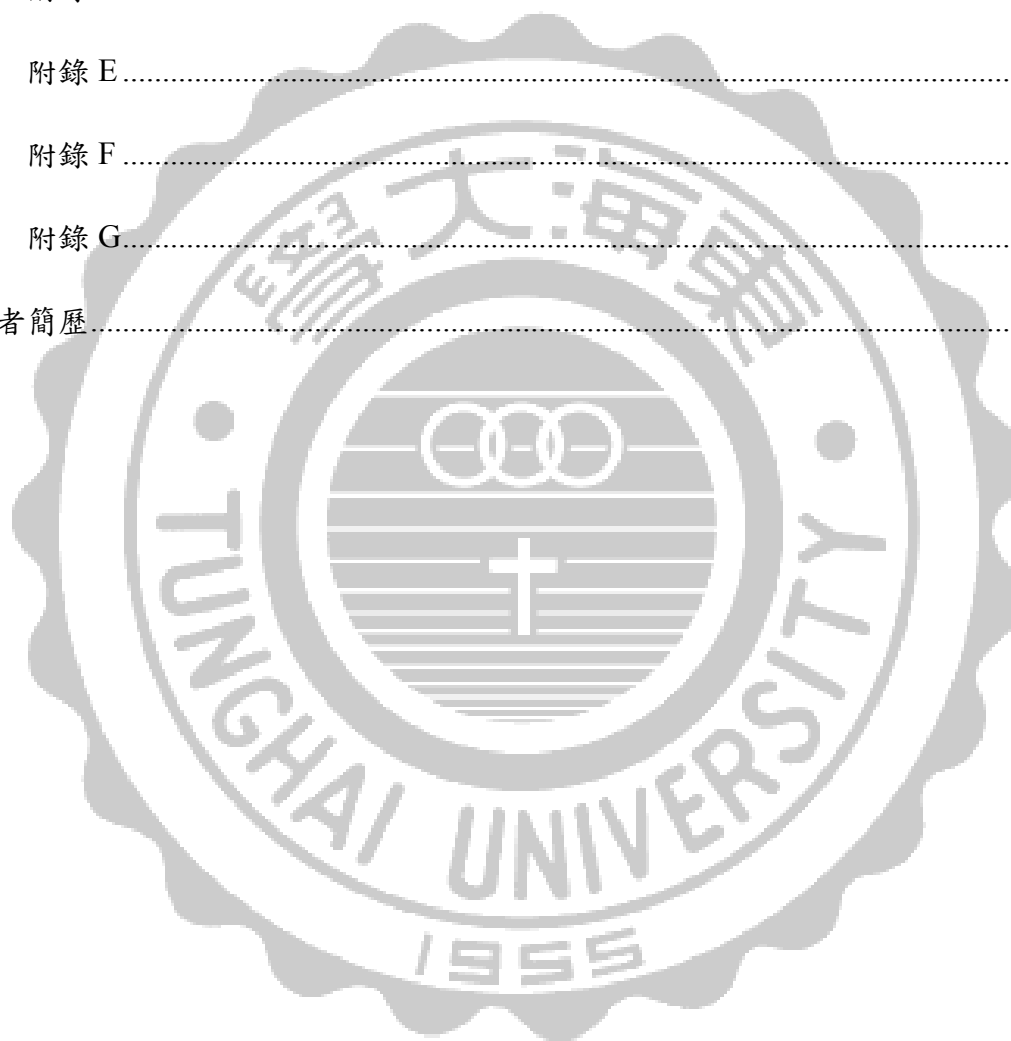
中文摘要.....	I
ABSTRACT.....	II
謝誌.....	IV
目錄.....	V
圖目錄.....	X
表目錄.....	XII
第一章緒論.....	1
第二章文獻回顧.....	2
2.1 生質柴油介紹.....	2
2.2.1 生質柴油副產物(Crude glycerol).....	4
2.2 微生物油脂介紹.....	7
2.3 油脂性微生物的介紹.....	9
2.3.1 微藻.....	9
2.3.2 細菌.....	10
2.3.3 酵母菌與真菌.....	10
2.4 菌種選擇.....	12
2.4.1 菌種介紹— <i>Rhodotorula glutinis</i>	12
2.5 木質纖維素.....	14
2.5.1 物理預處理.....	15
2.5.2 化學預處理.....	15

2.5.3 物理化學預處理.....	16
2.5.4 生物預處理.....	16
2.6 水解基質的成分.....	17
2.6.1 米糠.....	17
2.6.2 螺旋藻.....	17
2.7 微生物產油機制.....	19
2.8 影響微生物油脂產量因子.....	22
2.8.1 pH 值.....	22
2.8.2 光.....	22
2.8.3 碳源和氮源.....	23
2.8.4 碳源.....	23
2.8.5 氮源.....	23
2.8.6 無機鹽和微量元素.....	24
2.9 微生物油脂發酵策略介紹.....	25
2.9.1 批次微生物油脂發酵.....	25
2.9.2 兩階段培養策略.....	25
第三章 材料與方法.....	26
3.1 實驗材料.....	26
3.1.1 菌株.....	26
3.1.2 實驗裝置.....	27
3.1.3 木質纖維水解液之基質.....	29
3.1.4 實驗藥品.....	30

3.2 實驗儀器.....	32
3.3 分析方法.....	33
3.3.1 菌體乾重 (Dry cell weight, DCW) 分析方法.....	33
3.3.2 葡萄糖濃度分析方法.....	33
3.3.3 脂質含量 (lipid content) 濃度分析方法.....	33
3.3.4 甘油分析方法.....	33
3.3.5 還原糖測試.....	34
3.3.6 糖類、抑制物分析.....	34
3.4 實驗方法.....	35
3.4.1 原始菌種保存.....	35
3.4.2 培養基組成.....	35
3.4.3 水解農業廢棄物.....	36
3.4.4 接菌.....	36
3.5 實驗架構.....	37
3.6 實驗培養架構.....	38
3.6.1 水解預處理測試.....	38
3.6.2 搖瓶批次發酵實驗 (flask experiment).....	39
第四章結果與討論.....	43
4.1 木質纖維水解液成分分析.....	43
4.2 稀酸水解預處理.....	45
4.2.1 水解時間之影響.....	45
4.2.2 不同酸對於水解預處理之影響.....	47

4.2.3 水解溫度之影響.....	49
4.2.4 酸水解預處理之比較.....	51
4.3 搖瓶批次發酵實驗 (flask experiment).....	53
4.3.1 培養時間之影響.....	53
4.3.2 不同碳源之影響.....	55
4.3.3 碳源濃度之影響.....	57
4.3.4 有機氮源濃度之影響.....	59
4.3.5 混合碳源之影響.....	61
4.4 發酵槽批次程序.....	63
4.4.1 攪拌式發酵槽批次程序.....	63
4.4.2 氣舉式發酵槽批次培養.....	65
4.5 發酵策略的比較.....	73
第五章結論與未來展望.....	79
5.1 結論.....	79
5.2 未來展望.....	80
參考文獻.....	81
附錄.....	88
附錄 A.....	88
附錄 B.....	89
附錄 C.....	90
附錄 D.1.....	91
附錄 D.2.....	92

附錄 D.3.....	93
附錄 D.4.....	94
附錄 D.5.....	95
附錄 D.6.....	96
附錄 D.7.....	97
附錄 E.....	98
附錄 F.....	99
附錄 G.....	101
作者簡歷.....	102



圖目錄

圖 2-1 轉酯化之生質柴油	3
圖 2-2 開放式培養系統	10
圖 2-3 <i>Rhodotorula glutinis</i> 之培養裝置圖	11
圖 2-4 光學顯微鏡下所觀察到 <i>Rhodotorula glutinis</i> 的細胞型態	12
圖 2-5 前處理對木質纖維素生物質的效果示意圖	1420
圖 2-6 檸檬酸循環代謝圖	20
圖 2-7 脂肪酸累積代謝圖	20
圖 2-8 微生物形成不飽和脂肪酸代謝路徑	21
圖 3-1 <i>Rhodotorula glutinis</i> 在 agar plate 上之外觀	26
圖 3-2 攪拌式發酵槽	27
圖 3-3 氣舉式發酵槽	29
圖 3-4 木質纖維水解液之基質	29
圖 4-1 水解米糠之加熱時間對還原糖生成量之影響	46
圖 4-2 水解螺旋藻粉之加熱時間對還原糖生成量之影響	46
圖 4-3 不同酸水解對還原糖生成量之影響	48
圖 4-4 不同反應溫度下對還原糖生成量之影響	50
圖 4-5 Timing course 對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響	54
圖 4-6 不同碳源對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響	56
圖 4-7 不同起始還原糖濃度對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響	58
圖 4-8 不同起始有機氮源濃度對 <i>R. glutinis</i> 生長與累積油脂的影響	60

圖 4-9 不同混合碳源比例對 <i>R. glutinis</i> 的生長及累積油脂之影響.....	62
圖 4-10 纖維水解液的發酵策略下， <i>R. glutinis</i> 的生長之變化.....	64
圖 4-11 在通氣量 1 vvm 氣舉式發酵槽， <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	66
圖 4-12 在通氣量 2 vvm 氣舉式發酵槽， <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	66
圖 4-13 比較不同發酵槽對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	67
圖 4-14 比較不同通氣量在氣舉式發酵槽對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	67
圖 4-15 纖維水解液和粗甘油之混合碳源對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	70
圖 4-16 米糠水解液和粗甘油之混合碳源對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	70
圖 4-17 螺旋藻水解液和粗甘油之混合碳源對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	71
圖 4-18 比較混合碳源和純碳源對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	71
圖 4-19 不同木質素纖維水解液混合粗甘油對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	72

表目錄

表 2-1 各種替代燃料的評價比較.....	3
表 2-2 粗甘油微量元素分析表.....	5
表 2-3 微量元素對細胞生理功能之影響.....	6
表 2-4 Oil content of some microorganisms.....	8
表 2-5 Lipid composition of some microorganisms.....	8
表 2-6 米糠的主成分及含量.....	17
表 3-1 實驗藥品清單.....	30
表 3-2 實驗儀器清單.....	32
表 3-3 種子培養基.....	35
表 3-4 發酵培養基.....	36
表 4-1 木質素纖維水解液抑制物和醣類.....	44
表 4-2 酸水解預處理之比較.....	52
表 4-3 不同培養時間對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	54
表 4-4 不同碳源(30 g/l)對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	56
表 4-5 不同木質纖維水解液還原糖濃度對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	58
表 4-6 不同起始有機氮源濃度對 <i>R. glutinis</i> 生長與累積油脂的影響.....	60
表 4-7 不同混合碳源比例對 <i>R. glutinis</i> 的生長及累積油脂之影響.....	62
表 4-8 纖維水解液在批次策略下 <i>R. glutinis</i> 的生長及累積油脂之影響.....	64
表 4-9 不同通氣量在氣舉式發酵槽對 <i>R. glutinis</i> 的生長與累積油脂之影響.....	68
表 4-10 木質素纖維水解液混合粗甘油對 <i>R. glutinis</i> 生長及累積油脂之影響.....	72

表 4-11 各實驗之動力學參數比較	74
表 4-12 <i>Rhodotorula glutinis</i> 在不同低成本之碳源下的油脂含量比較 (I)	75
表 4-13 <i>Rhodotorula glutinis</i> 在不同低成本之碳源下的油脂含量比較 (II)	76
表 4-14 各種產油微生物在不同低成本之碳源下的油脂含量比較 (III)	77
表 4-15 各種產油微生物在不同低成本之碳源下的油脂含量比較 (IV)	78



第一章緒論

從上個世紀開始，隨著世界人口不斷增長，工業化國家越來越多，能源需求、環境問題與日俱增。石油、天然氣、煤炭等石化燃料，是主要能源提供來源，然而於二十一世紀中，石化燃料將逐漸枯竭，因此開發替代再生能源將成為重要議題。

生質柴油是具有發展性的替代生物燃料之一，它具有生物可降解性、無毒、可再生特性，以及類似與常規柴油特性之燃料，目前是由植物油與動物脂肪作為生產生物柴油之原料，隨著植物油有與民爭糧、與糧爭地之議，使得有必要探索第二代生物柴油燃料，從農業和森林殘留物和來自於木質纖維素非食品能源作物生產生質柴油的發展。

酵母菌是一株有效的產油性微生物，其可累積高達 60% 的細胞內油脂 (Xin Meng et al., 2009)，利用其油脂生產生質柴油，生長速度快亦可迅速累積油脂，在適當條件下，使用纖維素醣類作為碳源，可以大大降低生產成本，更具有資源永續發展的宏觀性。

第二章文獻回顧

2.1 生質柴油介紹

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

生質柴油(Biodiesel)又稱生物柴油，是一種潔淨之替代燃料，因不含石化成分，且可以獨立或與石化柴油混合使用於既有或稍作少許修改之柴油引擎，是一種使用方便、無毒、生物可分解之燃料。生產生質柴油最常見的方法係以可再生的生質能為原料與醇類混合，經過轉脂化反應後所形成的一種直鏈烷基酯燃料(脂肪酸甲酯或脂肪酸乙酯)，如圖 2-1，實驗室利用沙拉油進行鹼催化轉酯化反應生產，上層為轉酯化之生質柴油，下層為粗製甘油。

生質柴油是以取代石化柴油為目標的替代能源，利用化學轉酯化技術將植物或是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，產物可直接使用於柴油引擎。生質柴油的原料種類廣泛，舉凡向日葵油、花生油、大豆油、椰子油、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。生質柴油具有可再生性、生物可分解性、不含硫不會導致酸雨、可減少溫室氣體之排放和較佳的發動機低溫啟動性能等優點；此外其十六烷值、燃燒性能、抗爆性能和潤滑性能等均優於石化柴油，且其閃火點高，有利於安全運輸和存儲，因此生質柴油產業具有相當大的發展潛力(江建忠,2008)，表2-1為各種替代燃料的性能比較，由表可知生質柴油的綜合性能與石化柴油相似，利用生質柴油取

代石化柴油將成為未來的趨勢。



圖 2-1 轉酯化之生質柴油，上層為轉脂化之生質柴油，下層為粗製甘油。

表 2-1 各種替代燃料的評價比較

各種替代燃料的評價比較:

評價指數最好者以"10"表示，最差者以"0"表示之

燃料	石化柴油	壓縮天然氣 CNG	液化天然氣 LNG	甲醇	乙醇	生質柴油
車輛成本	10	5	5	5	5	10
基礎設備成本	10	2	5	5	5	10
安全	7	4	3	1	3	8
運轉範圍	10	5	10	10	10	10
運轉成本	10	5	7	5	5	7
可靠性	10	7	5	3	3	10
顧客接受性	5	8	8	8	9	8
基金協助	1	10	2	0	2	2
訓練成本	10	5	5	5	5	10
燃料可用性	10	0	5	5	5	6
燃料品質	9	5	10	8	8	9
燃料價格穩定性	6	8	8	6	6	6
綜合分數	98	74	73	61	66	96

資料來源：美國黃豆協會網頁。

2.2.1 生質柴油副產物(Crude glycerol)

自植物油轉酯化的生質柴油已成為替代燃油並以極快的速度在市場上嶄露頭角。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，預計至 2011 年，生質柴油產量將達到 1.3 億公升。然而再轉脂化過程中，每得到 3 莫耳甲酯就會產生 1 莫耳的副產物-粗甘油，相當於總產物的 10%，在生質柴油需求量日漸增加下，其副產物甘油亦會大量累積。

不同甘油有很大的顏色差異，這是因為轉酯化的油源（如：大豆油、棕櫚油）本身就具有顏色，而一般生質柴油廠的油源為回收之食用油，含有氧化物因此產出的工業級粗甘油顏色呈深褐色。一般粗甘油皆以低價轉賣於甘油精煉廠，這是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，由於粗甘油內殘有甲醇、氫氧化鈉酯類，少量硫化物，蛋白質，微量元素，如表 2-2 所示 (J.C. Thompson et al.,2006) 等，因此純化粗甘油的每個步驟亦不可避免需要花費成本。在浪費更多相關處置費用已轉換為更高價值的產品前，開發粗甘油新用途，是我們迫切需要的。

在微生物培養基中，細胞需要碳源來增殖和合成產物，文獻中指出以生質柴油副產物粗甘油當作 *Pichia pastoris* 發酵培養的碳源，其細胞濃度可達到 10.5 g/L 並可得到 0.57 (g cell/g substrate) 之血紅球生成物 (EPO)，是以純甘油當作發酵碳源之產物的 1.4 倍，這是因為轉酯化過程中植物油的營養成分（維他命 A,E, 及微量元素）擴散到粗甘油中，這些成分對酵母的物理及生理功能都有正面的影響，如維持細胞膜的完整性、加強乙醇耐受力與增強抗氧化能力等 (Eda Cüelik et al.,2008)。而微量元素對細胞生理功能的影響如表 2-3 (Kenneth Todar,2004)。

由此可知，價格低廉的生質柴油副產物粗甘油經過生物轉化可以產生出高附

加價值的產物。

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

Analysis results of macro elements, carbon and nitrogen	
Ca (ppm)	19.75±1.5
K (ppm)	BDL*
Mg (ppm)	5.4±0.4
P (ppm)	58.7±6.8
S (ppm)	14.0±1.5
Na (%wt)	1.07±0.12
C (%wt)	26.3±0.58
N (%wt)	0.05±0.01

* BDL : Below the Detection Limit

表 2-3 微量元素對細胞生理功能之影響 (Kenneth Todar,2004)

Trace elements in crude glycerol	Pysiology
Ca	某些酶的輔因數，維持酶(如蛋白酶)的穩定性，芽孢和某些孢子形成所需，建立細菌感受態所需。
Mg	組成己糖磷酸化酶、異檸檬酸脫氫酶、核酸聚合酶等活性中心；葉綠素和細菌葉綠素的成分。
P	核酸、核蛋白、磷脂、輔酶及 ATP 等高分子的成分，做為緩衝系統調節培養基 pH。
S	含硫胺基酸 (半胱胺酸、甲硫氨酸等)、維生素的成分，谷胱甘肽可調節胞內氧化還原電位。
Na	細胞運輸系統組成成分，維持細胞滲透壓，維持某些酶的穩定性。

2.2 微生物油脂介紹

微生物油脂又稱單細胞油脂，利用其來生產生質柴油，已引起世界各國高度的重視。雖然，有很多物種都具備累積油脂的能力，如微藻、細菌、真菌和酵母菌(Xin Meng et al., 2009) (表 2-4)，但並不是所有的油脂都適用於生產生質柴油，只有皂化脂類和游離脂肪酸才能轉脂化成烷基脂(Vicente G et al.,2009)。根據報導指出，多數的含油酵母菌和微藻在成長過程中所累積的油脂，類似植物油(Aggelis G. et al.,1997)，因此是一種相當適合作為生質柴油使用的油料選項。

近年來，更有學者對於能累積疏水性油脂的微生物進行大量的研究，用來生產微生物油脂，特別是將其應用於製造生質柴油上。在微生物中，其累積油脂的程度或範圍，是受到遺傳基因所決定的，然而，最佳累積油脂的含量，更可以因為不同的物種或不同的菌株而有所差異。根據不同的微生物以不同的培養條件，如溫度、pH 值、培養時間等，其油脂含量與成分也就不同(Xin Meng et al., 2009) (表 2-5)。

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

表 2-4 Oil content of some microorganisms(Xin Meng et al., 2009)

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

表 2-5 Lipid composition of some microorganisms (Xin Meng et al.,2009)

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

2.3 油脂性微生物的介紹

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

2.3.1 微藻

微藻可視為受日光驅動的細胞工廠(圖 2-2)，透過光合作用能將大氣中的二氧化碳固定成具有潛力的生質燃料，微藻可以提供幾種不同類型的可再生生物燃料，如利用厭氧分解菌可將藻類細胞分解進而產生甲烷，而藻類細胞所累積的油脂可作為生質柴油的原料，也可以透過藻類行光合作用的方式來產生生質氫氣。微藻成長迅速且富含油脂，達雙倍成長量僅需 24 小時，其平均脂質的含量界於 1% 到 70% 之間，但在特定的條件下，可獲得 90% 的脂質。現今微藻的年產值已達 5000 噸，其產生的營業額估計可達每年 1.25×10^9 美金。由於微藻具有較高的光合效率、較高生質能的產生且比起能源作物有較快的生長速率，使得微藻被視為良好的生產微生物油脂的菌株之一。



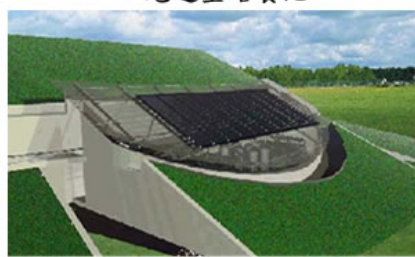
圓形培養池



跑道型培養池



大型淺池



斜板型培養池

圖 2-2 開放式培養系統(洪, 2007)

2.3.2 細菌

雖然微藻是一種高油脂含量的微生物，但是相較於細菌、真菌、酵母菌，培養微藻必需利用到較大、較廣的土地面積(圖 2-3)，且發酵周期比細菌長。如表 2-3 所示，幾乎所有的細菌所累積的油脂含量較微藻低，平均的油脂含量大約在 20~40%之間，如 *Arthrobacter sp.* 和 *Acinetobacter calcoaceticus* 的油脂含量分別為 40%和 38%。細菌利於生產微生物油脂的優勢，主要在於細菌的成長速率最快，達最大菌數量只需要 12~24 小時且易於培養。

作為替代的方案，儲存並累積油脂的細菌，特別以放線菌家族較有利於使用，在生長受到限制且碳源為葡萄糖的條件下，放線菌能累積約 70%的脂肪酸於細胞內且以三酸甘油脂的形式作儲存。然而，大多數的細菌普遍都不是油脂的生產者，只有很少量的細菌能累積複雜的類脂物，如聚羥基烷酸脂。由於油脂性細菌所產生的類脂物是在外膜上所形成的，導致萃取困難，使得油脂性細菌較少應用於生產微生物油脂的製程上。

2.3.3 酵母菌與真菌

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

油脂酵母菌和黴菌所累積的油脂中，也富含不飽和脂肪酸的成分，通常是以

油酸(C18:1)、亞油酸(C18:2)、棕櫚酸(C16:0)或棕櫚油酸(C16:1)為主(表 2-4)，其中不飽和脂肪酸所占的含量較高。根據文獻指出，著名的產油酵母菌株 *Rhodosporidium toruloides* Y4 和 *R. toruloides* CBS 14 所累積的長鏈脂肪酸主要也是由 C16 和 C18 所構成(Evan CT. et al., 1984)。最近，也有文獻證實利用搖瓶進行連續批次的方式來培養 *Rhodosporidium toruloides* Y4，在培養 25 天之後，菌體濃度和細胞脂質含量分別可達到 151.5 g/l 和 48.0%(w/w)(Li Yonghong. et al.,2007)。絲狀真菌-Mortierella alliacea Strain YN-15 在 50-L 的發酵槽中培養至第 7 天時，菌數量和總脂質量分別可達到 46.1 g/l 和 19.5 g/l，其中有 7.1 g/l 是以花生四烯酸(ARA,C20:4n-6)的形式來做累積(Takeno Seiki. et al.,2005)。依據這些數據顯示，油酯酵母菌與真菌是很有潛力作為生質柴油的替代性原料之來源，圖 2-3 為本次實驗培養 *R. glutinis* 之裝置圖。



圖 2-3 左：*Rhodotorula glutinis* 之搖瓶培養裝置圖；中：*Rhodotorulaglutinis* 之攪拌式發酵槽裝置圖；右：*Rhodotorulaglutinis* 之氣舉式發酵槽裝置圖

2.4 菌種選擇

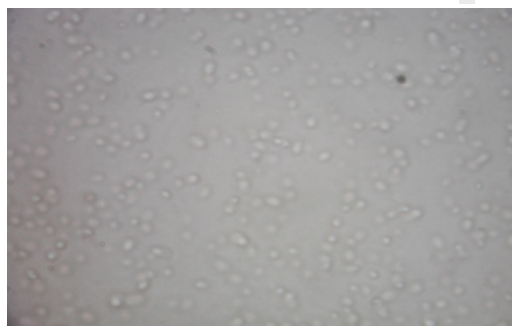
在油脂性微生物中，酵母菌是有優勢於細菌、真菌及微藻。這是由於酵母菌屬於單細胞生物，相對有較高的成長速率，且具備迅速累積油脂的能力，還可以利用價格較低廉的培養基，如營養物質從農業或工業殘餘物中所取得等(Xue F et al.,2006)。

2.4.1 菌種介紹—*Rhodotorula glutinis*

Rhodotorulaglutinis 屬於紅酵母菌的成員之一，也屬於腐生菌的一類，抗逆性較強，廣泛分布於各種生態環境中。從陸地到海洋、赤道到兩極均有紅酵母的存在。在陸地，紅酵母可以存在於各種底物上，如土壤、糞肥、動植物體及一些低等生物中；在海洋，紅酵母也是大量存在的酵母菌種類。此外，其他水域如江河、湖泊均有紅酵母存在。

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

(a)



(b)

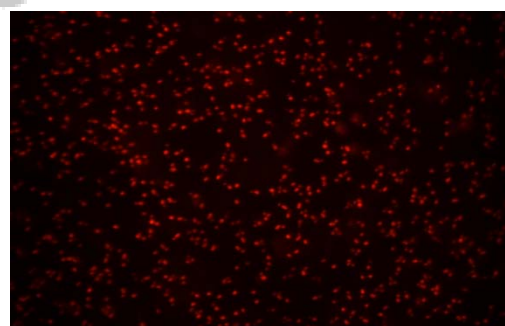


圖 2-4(a) 為用光學顯微鏡,再放 400 倍下所觀察到 *Rhodotorula glutinis* 的細胞型

態，呈圓形或卵圓形；(b)為用倒立式螢光顯微鏡(添加 Nile red)，在 400 倍所觀察到 *Rhodotorula glutinis* 的細胞顏色為紅色



2.5 木質纖維素

木質纖維素是由纖維素，半纖維素和木質素組成。由煤灰，蛋白質，果膠等材料中發現，其基於不同比例的木質纖維素殘渣，而這些可以根據它們的來源，如工業廢物（鋸末，造紙廠丟棄，食品工業的殘渣等），林業廢物（草，硬和軟木材等），農業殘餘物（稻草，稻稈，果殼，非食品種子等），國內垃圾（廚房垃圾，污水，廢紙等），以及城市固體廢物。由於纖維素和半纖維素與木質素在植物細胞壁的密切聯繫，因此預處理是必要的，可使用於酵素水解和化學水解等方法分解這些碳水化合物(Shuvashish Behera et al.,2014)。

預處理是以打破木質素、半纖維素的結構，並破壞纖維素的晶體結構，從而使酸或酵素可以很容易的將纖維素水解成單體。雖然預處理是在生物質燃料的轉化最昂貴的過程，但如果改進預處理的製程效率，其具有很大的潛力(Carvalho et al.,2008)。

預處理方法可以分成不同的類別：物理（削薄和研磨），物理化學（蒸汽爆炸，水熱解，濕式氧化等），化學（鹼，稀酸，氧化劑和有機溶劑），生物電等，預處理的概略結構如圖 2-5。

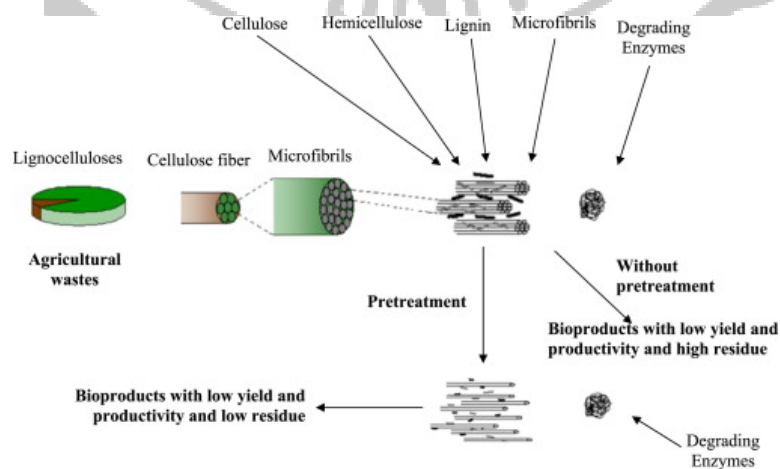


圖 2-5 前處理對木質纖維素生物質的效果示意圖 (Shuvashish Behera et al., 2014)

2.5.1 物理預處理

物理預處理是用來增加木質纖維素的表面積和孔尺寸，並降低了纖維素存在的聚合的結晶度，不同類型的物理過程，如研磨（球磨機，雙輥磨，錘磨，膠體磨和振動能研磨）、切削、研磨和輻射（ γ 射線和電子束）可以被用來改善酵素水解木質纖維素。

增加酵素水解木質纖維速，最有效的方法就是將木質纖維素的尺寸減小，然而，許多的物理方法粉碎（研磨和研磨）因為高能量需求在經濟是不可行的，在這方面，擠出機是一種新的工具且有前途的物理預處理方法，其擠出材料進行加熱、混合和剪切(Karunanithy C et al.,2010)。

2.5.2 化學預處理

除去木質素和半纖維素來提高纖維素的生物降解性，並降低聚合度（DP）和纖維素組分的結晶度，化學預處理已成為最有潛力的方法之一(Agbor VB et al.,2011)。它已被廣泛地研究在紙漿和造紙工業中的纖維素材料脫木素；在工業預處理過程中，其被利用來提高生物質的消化率；此外也有一些化學物質其中已報導對木質纖維素生物質的天然結構有顯著作用，不產生有毒殘留物，並且可在室溫室壓下反應。

化學品的範圍從氧化劑，鹼，酸和鹽均可用來降解木質素，半纖維素和纖維素。有機酸如草酸，乙酰水楊酸和水楊酸可作催化劑，而有機或含水有機溶劑混合物與無機酸（鹽酸或硫酸）被用來打破內部木質素和半纖維素的氫鍵。但是，在預處理中，濃酸類在經濟上是不可行的，因為具有腐蝕性的，必須回收，因此一般化學預處理都使用稀酸類。

2.5.3 物理化學預處理

物理化學預處理結合化學和物理過程溶解半纖維素木質素的結構，這一類包括的預處理方法，如蒸汽爆炸，液體熱水，冷凍爆炸，濕式氧化，氨循環滲漉，氨水，有機溶劑。近來，已提出離子液體和木質纖維素分餾過程等物理化學預處理方法，這些類型的預處理方法受限於生物質的物理和化學性能，選擇其能接受的有機溶劑(Sathitsuksanoh N et al.,2012)。

2.5.4 生物預處理

生物預處理大多是以真菌產生的酵素來降解木質素、半纖維素，其具有潛在優勢:低能量、不產生有毒化合物和產量高，然而缺點是生物預處理是一個非常緩慢的過程，需要小心控制的生長條件和較大的空間。此外，大多數微生物溶解和消耗不只有木質素、半纖維素、纖維素而已，因此生物預處理面臨著技術和經濟挑戰，最近的研究表明在該方向上的興趣日益增加。

2.6 水解基質的成分

本實驗使用了兩種廢棄物作為水解木質纖維素的基質：米糠和螺旋藻，以下為米糠和螺旋藻的成分說明。

2.6.1 米糠

米糠是糙米內核被同時研磨糙米到白去掉外層，而麩皮主要包括果皮，糊粉層、內核子糊粉層、包括胚胎或胚芽，和少量澱粉質胚乳。米糠粉是高蛋白質，纖維和生物活性的化合物，優點為降低血液中的膽固醇和減少動脈硬化疾病的發病率，並且有潤腸通便的作用(Pitchaporn Wanyo et al., 2009)。表 2-6 為米糠的主成分及其含量。

表 2-6 米糠的主成分及其含量

Components	
Moisture	12.34±0.24
Protein	13.17±0.12
Fat	20.36±0.01
Carbohydrate	32.37±0.26
Ash	11.12±0.01
Fiber	11.39±0.00
Amylose	3.63±0.06

2.6.2 螺旋藻

1921 年，生物學家首先在非洲查德湖畔發現了螺旋藻。四零年初法國藻類學家 Dangeard 描述在非洲查德湖附近的土著，採集湖中的螺旋藻，曬乾後與穀類攪拌或作為羹湯食用；無獨有偶地，墨西哥的阿茲提克人以 Texcoco 湖中的螺旋藻，作為主要蛋白質來源；直到 1963 年，法國學者克里蒙德 (G. Clement)

博士發現螺旋藻有豐富的營養價值，才開始對其營養成分與人工養殖進行基礎研究。

生產商業性螺旋藻，目前已遍及全球，乾燥後的螺旋藻可添加於食品中（Cifelli, 1983; Belay et al., 1993）。螺旋藻的成分：蛋白質（佔乾重 60~70%）、維生素（B12 和 β -胡蘿蔔素含量高）、礦物質、必須胺基酸和脂肪酸，特別是 γ -次亞麻油酸（GLA）含量豐富（Belay et al, 1993）。

螺旋藻使用在人類食品添加物已經有二十年的歷史，對於醫療也有許多臨床報告。其中主要的功能有：降低血液中膽固醇含量、 β -胡蘿蔔素可預防癌症及減緩病情、營造腸胃中健康的乳酸桿菌群、減輕汞及藥物對於腎的毒性、 γ -亞麻油酸(GLA)可刺激前列腺素作用、藻藍蛋白(Phycocyanin)可提高免疫系統、輻射的保護、提高鐵的吸收及調理貧血症及減肥。

2.7 微生物產油機制

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

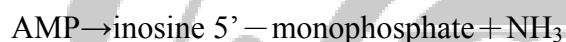
- I. 能連續地提供細胞為了產生脂肪酸合成酵素所需的前驅物—acetyl-CoA。
- II. 能充分地提供脂肪酸合成過程中所需的還原劑—NADPH。

以下分別簡述 acetyl-CoA 及 NADPH 的生成機制：

acetyl-CoA

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

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



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

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

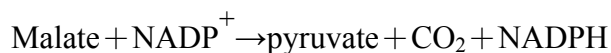
V. 因此 citrate 得以累積於粒線體內，而足夠的 citrate 進入細胞質後，被

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



NADPH

經由 malic enzyme 可得 NADPH：



以上文字敘述可由圖 2-6 表示：

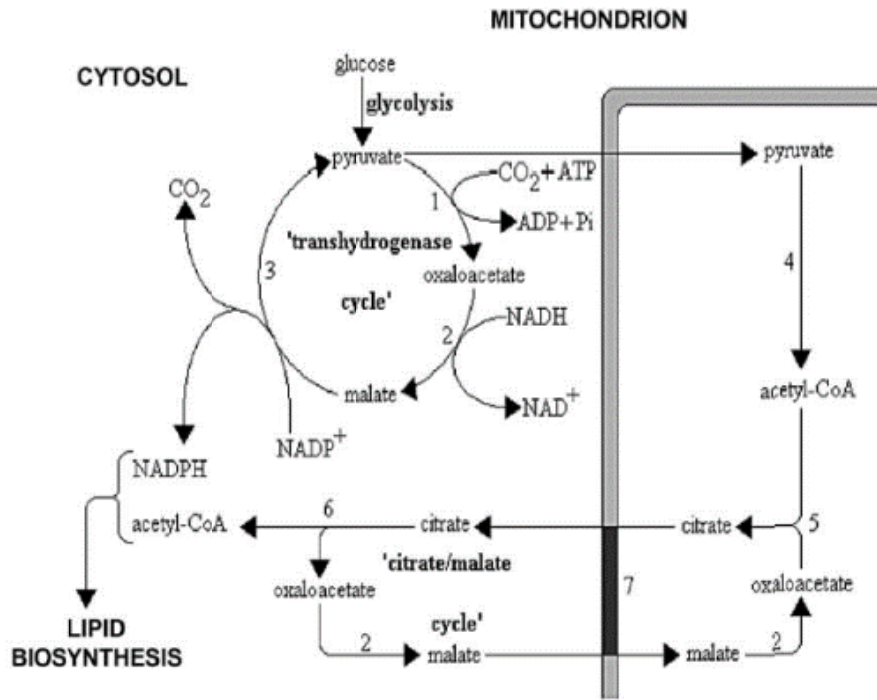


圖 2-6 檸檬酸循環代謝圖 (C. Ratledge,2004)

綜合以上，可由圖 2-7 表示整個油脂 (脂肪酸) 的累積機制：

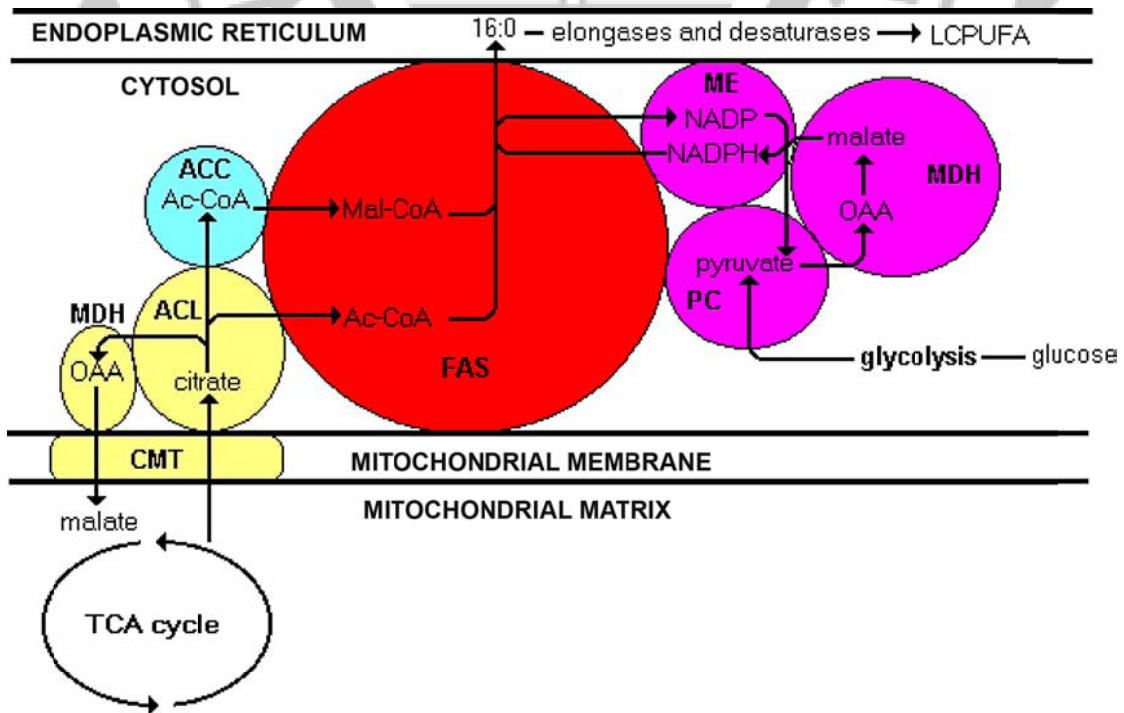


圖 2-7 脂肪酸累積代謝圖(C. Ratledge,2004)

在所有的含油微生物中，脂肪酸的代謝生成為 C16 或 C18 的飽和脂肪酸，而這些脂肪酸透過序列修飾與飽和酶延伸，產生不飽和脂肪酸，代謝圖如圖 2-8。

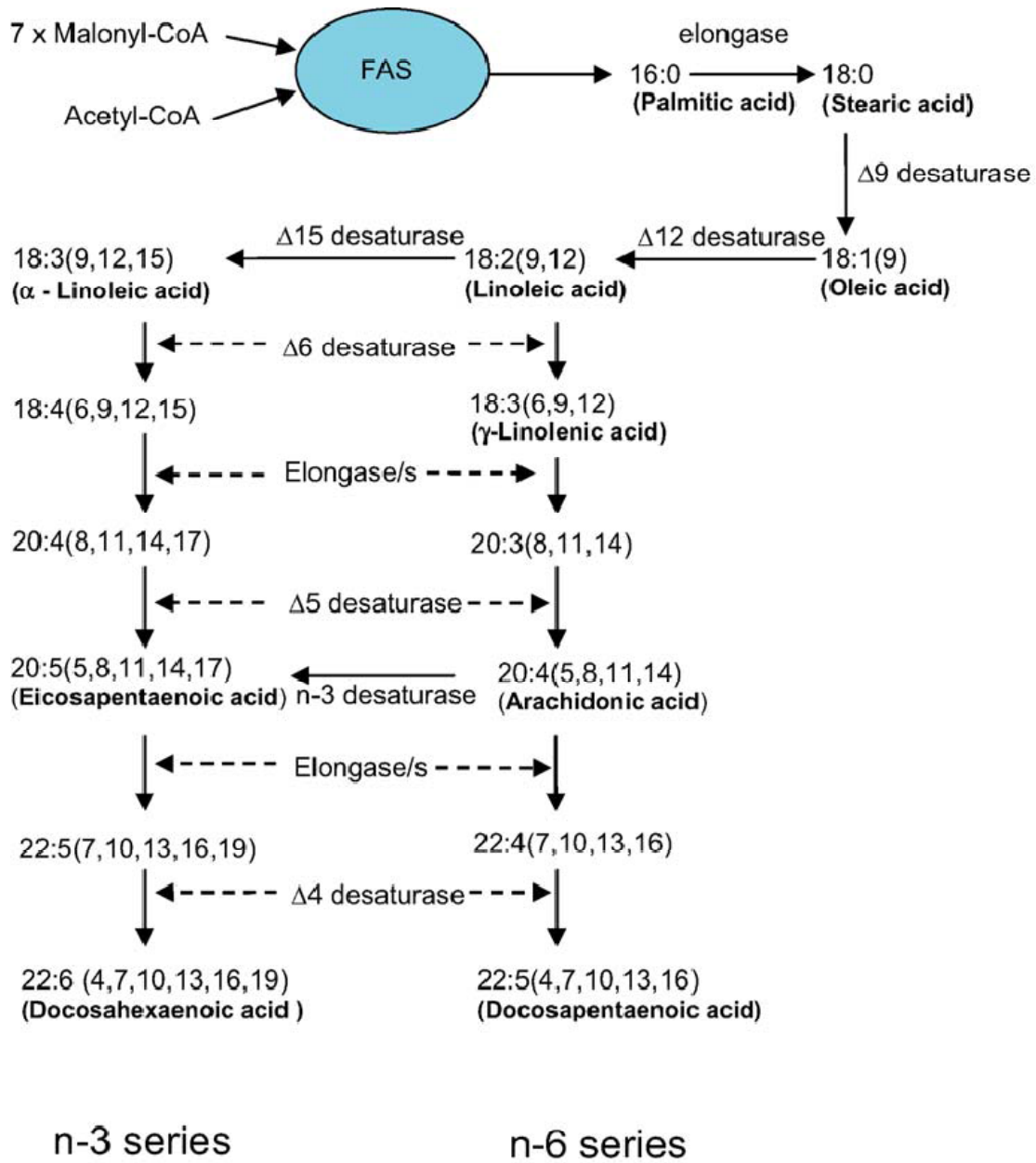


圖 2-8 微生物形成不飽和脂肪酸代謝路徑(C. Ratledge,2004)

2.8 影響微生物油脂產量因子

微生物累積油脂的生理機制，已獲得良好的研究，根據文獻指出，微生物必須在碳源(葡萄糖、甘油、糖蜜等)過剩相對氮源(peptone、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等)受到限制的條件下，才能更有效的產生並儲存油脂於細胞中。因此，微生物成長與累積油脂受到培養基中碳氮比(carbon-to-nitrogen ratio)和其他因素，如溫度、pH 值、溶氧量、培養時間等影響。

2.8.1 pH 值

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

2.8.2 光

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

近年來光對於真菌的影響也開始受到重視，最著名的例子就是由 *Aspergillus nidulans* 中發現含有光敏素(phytochrome)會對紅光及遠紅光產生反應，在接受紅光時它會行無性生殖，而當接受到遠紅光時則會行有性生殖(Anne Blumenstein et al.,2005)。

對於某些含有光接受器的真菌，如 *Penicillium brevicompactum*、*Aspergillus nidulans* 等來說，雖無法像植物能將光能直接轉變成可供利用的能源，但能透過

照光之方式，去改變體內蛋白質合成的途徑，因而間接地影響到菌體的生長與代謝產物的生成。

2.8.3 碳源和氮源

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

2.8.4 碳源

碳源為供應細胞生長的能量以及骨架形成的必需來源，並可提供細胞良好的生長，但是濃度過高時會對菌體有抑制情形出現，因為濃度高時其培養基的滲透壓也較高所致。根據文獻指出，有學者選擇利用生質柴油工廠的副產物粗乾油、木質纖維素之水解糖化液作碳源，對 *Rhodotorula glutinis* 生產油脂及類胡蘿蔔素來進行探討，以有效降低生產成本和解決與民爭食等問題(Saengea C. et al., 2011)。

2.8.5 氮源

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

2.8.6 無機鹽和微量元素

磷在細胞能量轉移方面扮演了重要的角色，磷脂質與核酸的合成也需要有磷的存在，因 ω -3 系多元不飽和脂肪酸主要存在細胞的極性之脂質中，如磷脂質，因此磷也會影響多元不飽和脂肪酸的合成。根據文獻指出，培養基中的碳磷比(C/P)，會直接影響到 *Rhodospiridium toruloides* Y4 累積脂質的含量(Siguo Wu et al., 2010)。

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



2.9 微生物油脂發酵策略介紹

2.9.1 批次微生物油脂發酵

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

2.9.2 兩階段培養策略

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

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

第三章 材料與方法

3.1 實驗材料

3.1.1 菌株

本實驗所採用的菌株 *Rhodotorula glutinis*，是購自生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center)，菌種編號：BCRC 22360。



圖 3-1 *Rhodotorula glutinis* 在 agar plate 上之外觀(Zhiyong, 2011)

3.1.2 實驗裝置

3.1.2.1 攪拌式發酵槽

如圖 3-2 所示，本次實驗使用體積為 5 L 之攪拌式發酵槽，此類型反應器具有機械式攪拌葉片、進氣管口於槽體底部，藉由葉片的機械攪拌，由底部進入槽體的氣體能與流體在整個系統中均勻混和，混和性佳、高質傳能力、高剪切力等，是攪拌式發酵槽最主要的優點，是目前工業上應用最廣泛的反應槽型。混和性佳與高質傳能力造成高溶氧環境，但是高度剪切力的特性並不適合微生物發酵，因為剪切力過高容易使菌體受到傷害進而影響菌體生長、代謝機制、生產速率和產量。因此，自動控制系統，在攪拌式發酵槽的發酵程序中是必要的，利用自動偵測系統，監測溫度、槽體壓力、溶氧量、酸鹼值，並以電腦調控利用饋料系統控制酸鹼值、控制攪拌速率維持溶氧量、循環水系統控制溫度、以及自動排進氣系統控制槽體壓力，以達到最佳化並穩定之微生物培養環境。



圖 3-2 攪拌式發酵槽

3.1.2.2 氣舉式發酵槽

如下圖 3-3 所示，本次實驗使用的氣舉式發酵槽，槽體體積為 5 L，長度為 30 cm，外徑為 10 cm，管內徑為 7.7 cm。而氣舉式發酵槽的主要特色是以導流管分離出流體上升區域與下降區域，氣體由槽體底部進入上升區域並產生氣泡，由於氣泡於上升與下降區域中，大小分布不同而產生密度差，使反應槽內形成迴路流動充分混和發酵液。氣舉式發酵槽具有下列幾項優點：

- (1) 低剪切力傷害：由於沒有機械葉片轉動，因此對於菌體的剪接力傷害可以降到最低，是氣舉式發酵槽適合微生物發酵的主要原因。
- (2) 槽體結構簡單，設備成本低：由於氣舉式發酵槽沒有結構複雜的攪拌系統和機械軸，因此除了減少設備成本外，亦沒有額外的能量消耗問題。
- (3) 污染機率降低：由於氣舉式發酵槽沒有結構複雜的攪拌系統，因此不會有軸封滲漏污染與隱藏雜菌的問題。
- (4) 有較高的能量效率：由於氣舉式發酵槽內導流管的導流作用，使得內部的氣體與其帶動之流體在反應槽中能形成穩定的迴路流動，不需要外在提供的其他能量。

由上述優點可知，氣舉式發酵槽非常適合應用於微生物發酵工業，但應用於高黏度培養液時，氣體輸送效果會明顯下降，使整體循環效果不佳，同時容易產生泡沫。



圖 3-3 氣舉式發酵槽

3.1.3 木質纖維水解液之基質

如圖 3-4 所示，左一為核能所提供的纖維酵素水解液，中間為本次實驗所使用的米糠酵素水解液之基質，由苗栗鴨稻庄所提供，右一為本次綠藻酵素水解液之基質(螺旋藻)。



圖 3-4 木質纖維水解液之基質

3.1.4 實驗藥品

表 3-1 實驗藥品清單

中文名稱	英文名稱	廠牌
工業級甘油	Crude glycerol	又華股份有限公司
甘油	Glycerol	SHOWA
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
酵母萃取物	Yeast extract	DIFCOBD
硫酸銨	Ammonium sulfate	SHOWA
硫酸鎂	Magnesium sulfate heptahydrate	SHOWA
磷酸二氫鉀	Potassium dihydrogenphosphate	SHOWA
氯化鈣	Calcium dichloride dehydrate	聯合化學製藥
氯化鈉	Sodium chloride	SHOWA
鹽酸	Hydrochloric acid	Scharlau
硫酸	Sulfuric acid	Scharlau
磷酸	Phosphoric acid	SHOWA
硝酸	Nitric acid	SHOWA
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	SHOWA
氫氧化鉀	Potassium hydroxide	SHOWA
甲醇	Methanol	ECHO
氯仿	Chloroform	ECHO
正己烷	n-Hexane	TEDIA
棕櫚酸甲酯	Methyl palmitate,97%	Alfa Aesar
棕櫚油酸甲酯	Palmitoleic acid methyl ester	MP Biomedicals TM
硬脂酸甲酯	Methylstearate,99%	Alfa Aesar
油酸甲酯	Methyl oleate	ACROS
亞麻油酸甲酯	Linoleic acid methyl ester	MP Biomedicals TM
次亞麻油酸甲酯	Linolenic acid methyl ester	MP Biomedicals TM

(接續前頁)

中文名稱	英文名稱	廠牌
YM BROTH	Yeast Malt Broth	DIFCO BD
乙酸乙酯	Ethyl acetate	ECHO
乙腈	Acetonitrile	ECHO
異丙醇	Propanol	ECHO
甲酸	Formic acid	ACROS
乙酸	Acetic acid	SHOWA
木糖	Xylose	ACROS
羥甲基糠醛	Hydroxymethylfural,98%	ACROS
糠醛	Furaldehyde,98%	ACROS
戊醛糖	Arbinose	東京化成工業
β -胡蘿蔔素	Predominantly trans	MP Biomedicals™
丙酮	Acetone	ECHO
3,5 二硝基水楊酸	3,5-dinitrosalicylic acid	
纖維水解液		核能所
複合式纖維酵素	Viscozyme L	Novozymes
米糠		鴨稻庄

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	BJ100M
微電腦蒸餾水製造機	FISTEREEM	WSC044
超純水製造機	Millipore	Simplicity
磁石攪拌加熱器	ChromTech	MS-3250B
pH 計	Lutron	PH-206
高壓蒸氣滅菌釜	TRIDENT	EA635
無菌操作台	HIGH TEN	3BH-24
恆溫震盪培養箱	LIAN SHEN	LUS-150
5 公升攪拌式發酵槽	Biotop	
5 公升氣舉式發酵槽	Biotop	
試管震盪器	IKA	MS1 minishaker
微電腦分光光度計	Thermo	GENESYS 10UV
高速中型離心機	Hettich	Universal-32R
桌上型高速離心機	HERMLE	Z326
葡萄糖分析儀	YSI	2300STAT
冷凍乾燥機	PAN CHUM	CT-series
超音波震盪破碎機	MISONIX	S-3000
烘箱	LIAN SHEN	LO-150
超音波震盪器	DECTA	DC300H
桌上型微量離心機	HSIANGTAI	MCD-2000
紅外線水分蒸發儀	IR-35	DENVER
氣相層析儀	Thermo	Focus GC
高效率液相層析儀-UV	HITACHI	L-2400,L-2200,L-2130
高效率液相層析儀-RID	HITACHI	5450,5210,5110

3.3 分析方法

3.3.1 菌體乾重 (Dry cell weight, DCW) 分析方法

取 5 ml 的發酵液，離心 7,000 rpm 10 min，倒掉上清液，再加蒸餾水清洗並重複上述步驟。取下層菌體，至於鋁盤後利用紅外線水分蒸發儀，所得的數據經過換算，即可測得菌體之乾重(g/l)。

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 7,000rpm 10 min，分離菌體和上清液。取上清液並利用 YSI 2300STAT Glucose analyzer 來量測。

3.3.3 脂質含量(lipid content) 濃度分析方法

秤取冷凍乾燥後的菌體 50 mg，加入甲醇/氯(1:2, v/v)溶液 5 ml 以試管震盪器混合均勻，並以超音波破碎機破碎菌細胞(功率 5，作用時間 3 min)，然後靜置萃取 1 hr。再經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min。收集上層萃取液於已秤重之鋁皿，殘留之細胞再次加入 3 ml 甲醇/氯仿溶液萃取至無色，將所有萃取液放入 60°C 烘箱烘乾 48hr，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)。

3.3.4 甘油分析方法

取 5 ml 的發酵液，離心 7,000 rpm 10 min 取上清液，以 0.45 μm 針筒過濾膜過濾，依需求稀釋後以 HPLC (High performance liquid chromatography) 分析。

毛細管柱為 N50DS (250×4.68 mm)，注射體積為 50 μ l，移動相 (0.01 N H_2SO_4) 以流速 0.4 ml 分析 10 min。

3.3.5 還原糖測試

取 5 ml 的發酵液離心，離心 7,000 rpm 5 min 取上清液，將上清液稀釋 10 倍，取 1 ml 稀釋之上清液，加入 1 ml 的 3,5 二硝基水楊酸(DNS)，隔水加熱 10 min，冷卻後，利用微電腦分光光度計進行分析，波長 540 nm。

3.3.6 糖類、抑制物分析

主要分析糖類(葡萄糖、木糖、戊醛糖)、抑制物(甲酸、乙酸、羥甲基糠醛、糠醛)。取 5 ml 的發酵液，離心 7,000 rpm 10 min 取上清液。

以 0.22 μ m 針筒過濾膜過濾，依需求稀釋後，以高效能液相層析儀(HPLC-RID)分析。設定條件：管柱 87H3；溫度：65±1 $^{\circ}$ C；注射體積為 5 μ l；移動相為 0.008 N H_2SO_4 水溶液；流速 0.4 ml/min。

3.4 實驗方法

3.4.1 原始菌種保存

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

3.4.2 培養基組成

3.4.2.1 種子培養基 (Seed Medium, SM)

利用種子培養基培養 24 hr，溫度控制在 24 °C，轉速在 150 rpm，接種至發酵培養基中，以下為種子培養基。

表 3-3 種子培養基

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

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

3.4.2.2 發酵培養基 (Fermentation Medium, FM)

將種子培養基接種至發酵培養基中，探討不同變因對於 *R. glutinis* 的生長的影響，以下為發酵培養基。

表 3-4 發酵培養基

Compounds	Concentration (g/l)
Carbon source	30、60、90、120 g/l
Yeast extract	2.0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 g/l
KH ₂ PO ₄	1.0 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1 g/l
NaCl	0.1 g/l

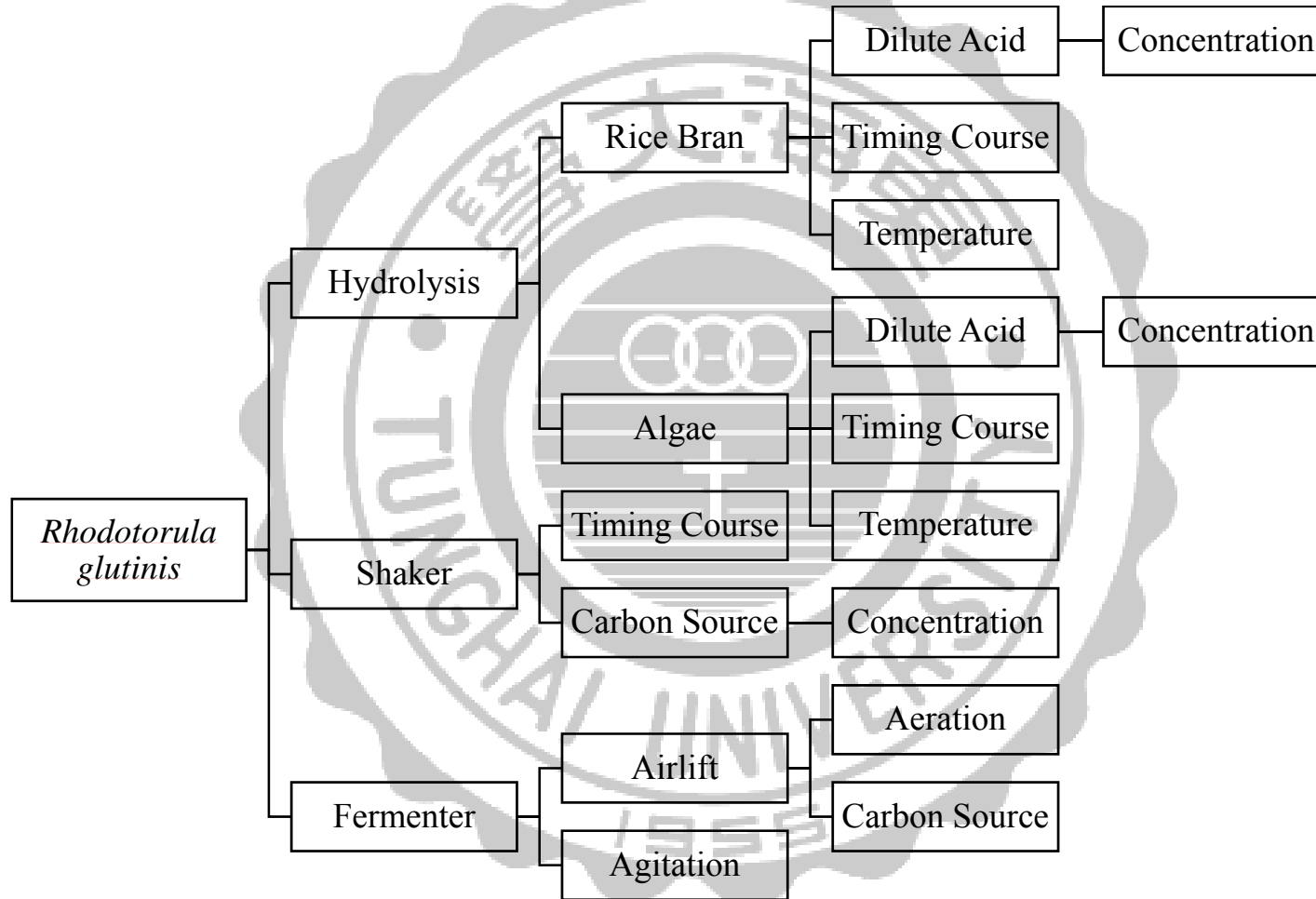
3.4.3 水解農業廢棄物

1. 將農業廢棄物(米糠、螺旋藻粉)加入2% 鹽酸水溶液，沸騰水隔水加熱 30 min，利用 100 mesh 篩網過濾，取固體部分。
2. 將第一步驟取得固體部分，加入蒸餾水，並且加入 0.1 % 酵素(Viscozyme L)，溫度：50±1°C，pH=3.0~3.5，酵素水解反應 7 天，利用抽氣過濾，取液體部分，即為培養菌體的碳源培養基底。

3.4.4 接菌

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

3.5 實驗架構



3.6 實驗培養架構

3.6.1 水解預處理測試

3.6.1.1 水解時間的影響

目的：探討水解時間對還原糖產量的影響。

- 1、取 0.5 g 基質(米糠、螺旋藻)，加入 5 毫升的 2% 鹽酸。
- 2、利用隔水加熱時間 30 min、60 min、90 min、120 min 進行測試。
- 3、冷卻後，利用 3,5 二硝基水楊酸(DNS)進行還原糖測試。

3.6.1.2 不同稀酸的影響

目的：探討不同稀酸(鹽酸、硫酸、硝酸、磷酸)對還原糖產量的影響。

- 1、取 0.5 g 基質(米糠、螺旋藻)，加入 5 毫升的鹽酸、硫酸、硝酸、磷酸。
- 2、隔水加熱 30 min。
- 3、冷卻後，利用 3,5 二硝基水楊酸(DNS)進行還原糖測試。

3.6.1.3 不同溫度的影響

目的：探討不同溫度隔水加熱，對還原糖產量的影響。

- 1、取 0.5 g 基質(米糠、螺旋藻)，加入 5 毫升的 2% 鹽酸。
- 2、利用 80 °C、100 °C、120 °C，隔水加熱 30 min。
- 3、冷卻後，利用 3,5 二硝基水楊酸(DNS)進行還原糖測試。

3.6.2 搖瓶批次發酵實驗 (flask experiment)

3.6.2.1 培養時間之影響

目的:探討培養時間對菌體生長與累積脂質之影響。

- 1、前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
- 2、於 50 ml FM 培養基中添加碳源濃度為 30 g/l 的纖維水解液。
- 3、以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中。

於 24°C、150rpm 培養箱中培養 48 小時，每 12 小時取樣三瓶。

3.6.2.2 不同碳源之影響

目的:探討不同碳源濃度為 30 g/l(葡萄糖、甘油、粗甘油、纖維水解液)對菌體生長與累積脂質之影響。

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

3.6.2.3 碳源濃度之影響

目的:探討培養基中不同起始纖維水解液濃度對菌體生長與累積脂質之影響。

- 1、前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
- 2、於 50 ml FM 培養基中各別添加濃度為 30、60、90、120 g/l 的纖維水解液。
- 3、以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中。

於 24°C、150rpm 培養箱中培養 48 小時。

3.6.2.4 有機氮源濃度之影響

目的:探討培養基中不同有機氮源濃度對菌體生長與累積脂質之影響。

- 1、前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
- 2、於 50 ml FM 培養基中各別添加 0、0.5、1.0、2.0 g/l 的有機氮源(yeast extract)。
- 3、以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中。

於 24°C、150 rpm 培養箱中培養 48 小時。

3.6.2.5 混合碳源之影響

目的:探討培養基中纖維水解液加上粗甘油對菌體生長與累積脂質之影響。

- 1、前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
- 2、於 50 ml FM 培養基中添加濃度為 30 g/l 纖維水解液和不同濃度 0、0.5、1、2 g/l 的粗甘油。
- 3、以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中。

於 24°C、150rpm 培養箱中培養 48 小時。

3.6.3 發酵槽批次程序(batch)

3.6.3.1 攪拌式發酵槽批次培養

目的:探討核能所提供的纖維水解液製程放大下，在攪拌式發酵槽中，對菌體生長與累積脂質之影響。

- 1、前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
 - 2、配製 3000 ml FM 培養基，濃度為 60 g/l 的稻稈水解液，於 5-L 發酵槽中。
 - 3、以 10%接菌量將 SM 接至上述 FM 中，培養基初始 pH 5.5，以 1N NaOH 調控 pH 5.5，溫度 24°C、溶氧量 30%、通氣量 1 vvm 下進行培養。
- 每 12 小時取樣，培養時間至生長曲線達穩定狀態。

3.6.3.2 氣舉式發酵槽批次培養

3.6.3.2.1 不同通氣量的影響

目的:探討核能所提供的纖維水解液製成放大下，在不同通氣量的氣舉式發酵槽中，對菌體生長與累積脂質之影響。

- 1、前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。
 - 2、配製 5000 ml FM 培養基，濃度為 60 g/l 的稻稈水解液，於 5-L 發酵槽中。
 - 3、以 10%接菌量將 SM 接至上述 FM 中，培養基初始 pH 5.5，以 1N NaOH 調控 pH 5.5，溫度 24°C、通氣量 1、2 vvm 下進行培養。
- 每 12 小時取樣，培養時間至生長曲線達穩定狀態。

3.6.3.2.2 不同碳源的影響

目的：探討纖維水解液(纖維水解液、米糠、螺旋藻)製成放大下，在氣舉式發酵槽中，對菌體生長和累積脂質之影響。

1、前培養 50 ml SM 培養基，培養 24 小時。

2、配製 5000 ml FM 培養基，濃度為 60 g/l 的纖維水解液、米糠、螺旋藻水解液，於 5-L 發酵槽中。

3、以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中，培養基初始 pH 5.5，以 1N NaOH 調控 pH 5.5，溫度 24°C、通氣量 2 vvm 下進行培養。

每 12 小時取樣，培養時間至生長曲線達穩定狀態。



第四章結果與討論

4.1 木質纖維水解液成分分析

在世界上，有大多數的木質纖維素來自於農業、工業和森林的殘留廢棄物，其被視為已知產量最豐富的再生碳水化合物的總生物量(K. Srilekha Yadav et al.,2011)，木質纖維素是一種比較複雜的澱粉機體，其由碳水化合物(纖維素、半纖維素)與木質素組成，細菌和真菌無法直接運用纖維素和半纖維素，需經過稀酸預處理分解半纖維素，再利用纖維酵素水解纖維素得到碳水化合物，而此種製程會產生一些抑制菌體生長的物質(Jeewon Lee,1997)。

分析結果如表 4-1 所示，纖維水解液的來源是來自於核能所，因此分析其單位使用每公升含有多少克的碳水化合物和抑制物。由於複合水解酵素不是只有水解出葡萄糖、木糖、和戊醛糖，因此使用還原糖分析總碳水化合物含量；每公克米糠水解液和螺旋藻水解液可得到 0.407 公克的還原糖，由於文獻(Guochang Zhanget al.,2011)指出會產生抑制酵母菌生長的物質分別為羥甲基糠醛、糠醛、甲酸、乙酸，其中又以糠醛、乙酸對酵母菌生長影響最深，核能所提供的纖維水解液中含有糠醛、乙酸濃度分別是 4.9 g/l、0.2 g/l，而米糠酵素水解液中含有糠醛、乙酸的產率分別是 0.17%、0.29%，螺旋藻酵素水解液中則含有糠醛、乙酸濃度分別為 0.31%、0.48%。

表 4-1 木質素纖維水解液抑制物和醣類

	Reducing sugar	Glucose	Xylose	Arabinose	Formic acid	Acetic acid	HMF	Furfural
纖維水解液 (核能所, g/l)	148.5	71	18.1	0.5	2.3	4.9	0.11	0.2
米糠水解液 (%, g/g)	40.7	21.1	7.2	0.16	0.17	0.17	0.12	0.29
螺旋藻水解液 (%, g/g)	40.7	18.1	7.1	1.5	42	0.48	--	0.31

4.2 稀酸水解預處理

4.2.1 水解時間之影響

本次實驗探討鹽酸在不同水解時間對於米糠、螺旋藻還原糖析出的影響。根據文獻指出(劉, 2008), 稀酸水解時間會影響還原糖和抑制物濃度的析出產率, 隨著時間的增長, 還原糖濃度會達到最大定量, 因此本次實驗利用 1、2、5% 的鹽酸, 在沸騰水煮 30、60、90、120 分鐘, 實驗結果如圖 4-1、圖 4-2 所示, 米糠水解液以稀鹽酸隔水加熱, 可得平均的還原糖生成率大約在 40~50%, 並且在 2% 的鹽酸沸水煮 30 分鐘, 得到最大還原糖生成率為 52.3%, 在 30 min 以後, 還原糖生成量已達成平穩, 幾乎不受水解時間而影響, 而螺旋藻水解液以稀鹽酸隔水加熱, 可得到平均得還原糖生成率約 15~35%, 並且以 5% 鹽酸沸水煮 30 分鐘, 得到最大還原糖生成率為 30.5%, 因此, 之後實驗以米糠為基質的水解選擇 2% 之稀酸沸水煮 30 分鐘, 而以螺旋藻為基質的水解選擇 5% 之稀酸沸水煮 30 分鐘進行水解預處理。

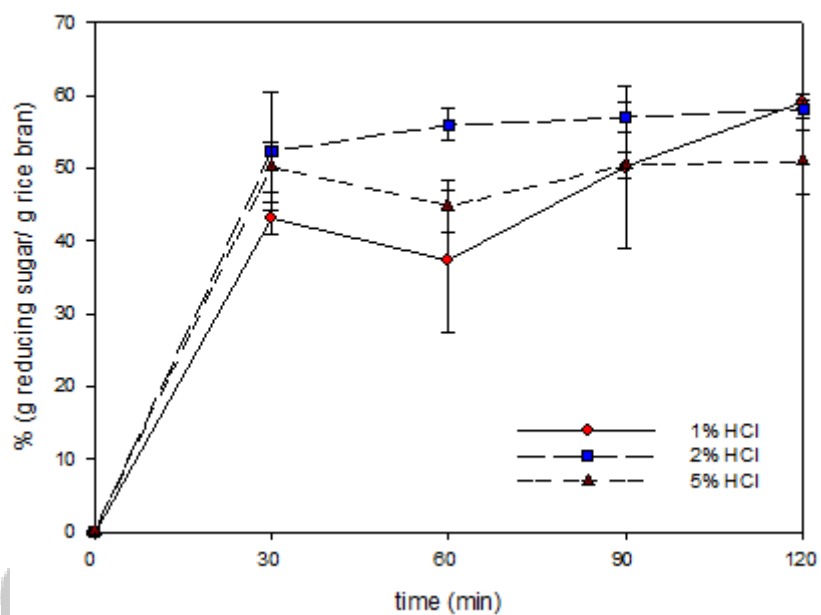


圖 4-1 水解米糠之加熱時間對還原糖生成量之影響 (反應溫度為 100 °C，米糠重量為 0.5 g；鹽酸和米糠比值(L/S)為 10)

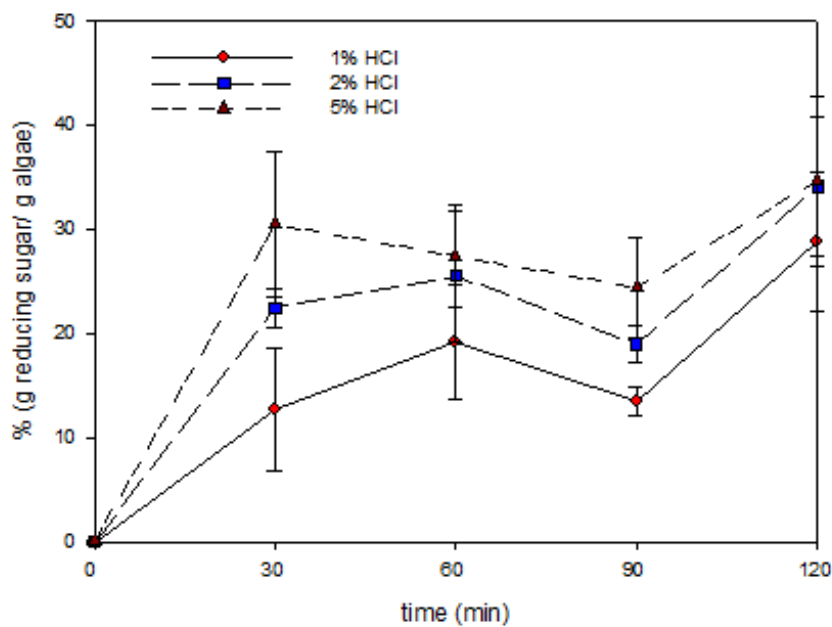


圖 4-2 水解螺旋藻粉之加熱時間對還原糖生成量之影響 (反應溫度為 100 °C，綠藻重量為 0.5 g，鹽酸和米糠比值(L/S)為 10)

4.2.2 不同酸對於水解預處理之影響

本次實驗探討不同酸對於水解米糠、綠藻的預處理之還原糖生成率之影響。不同的木質纖維素基質，利用不同稀酸做水解預處理，所產生之還原糖濃度也會不同，因此本次實驗利用四種稀酸做測試，獲得最佳還原糖濃度，其還原糖濃度越高，代表半纖維素和木質素水解越完全，下一階段的酵素水解程度會越好，實驗結果如圖 4-3 所示，以米糠為基質之水解預處理利用 2% 的鹽酸、硫酸、硝酸、磷酸在沸騰水煮 30 min 進行水解，分別得到還原糖生成率為 52.3%、48.7%、45.8%、14.8%。由實驗結果得知使用鹽酸做為預處理水解米糠時，可得到最高還原糖生成率，以綠藻粉為基質之水解預處理利用 5% 的鹽酸、硫酸、硝酸、磷酸在沸騰水煮 30 min 進行水解，分別得到還原糖生成率為 30.4%、30.3%、26.8%、2.8%。由實驗結果得知使用鹽酸做為預處理水解綠藻粉時，可得到最大還原糖生成率，因此後續進行米糠和綠藻粉水解預處理，分別使用 2%、5% 鹽酸進行水解。

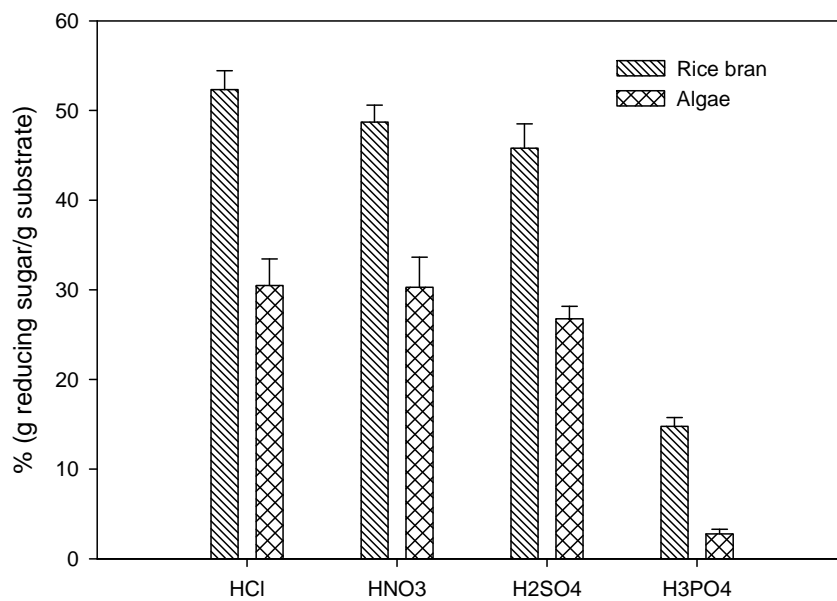


圖 4-3 不同酸水解對還原糖生成量之影響 (反應條件為 100 °C ; 以米糠(0.5 g) 為基質之稀酸濃度為 2% , 液態和固態比值 L/S=10 ; 以綠藻粉(0.5 g)為基質之稀酸濃度為 5% , 液態和固態比值 L/S=10 ; 反應時間為 30 min)

4.2.3 水解溫度之影響

本次實驗探討不同反應溫度(80、100、120°C)下，對於酸水解預處理的還原糖生成率之影響，其中 120 °C 是以高壓滅菌釜反應 30 min 下得到的結果。實驗結果如圖 4-4 所示，溫度為 80、100、120 °C 下，可分別得到還原糖生成量分別為 17.4%、52.3%、47%，由實驗結果可得知，在 100 °C 之溫度水解米糠，可以得到最高的還原糖生成率，而在溫度為 80、100、120 °C 水解螺旋藻粉時，分別得到還原糖生成量為 24.1%、30.5%、25.2%，由實驗結果可得知，在 100 °C 之溫度水解螺旋藻粉，可得到最高之還原糖生成率，其實驗結果的可能原因為 80 °C 之溫度太低，不足以使基質水解完全，由於在室壓下，難以將水溫提升至 120 °C，因此使用高壓滅菌釜將溫度提升至 120 °C，而除了高壓下可能會導致水解效果不如預期外，使用高壓滅菌釜耗費能源過大，不符合成本需求，因此後續實驗水解預處理皆選擇在 100°C 沸騰水加熱。

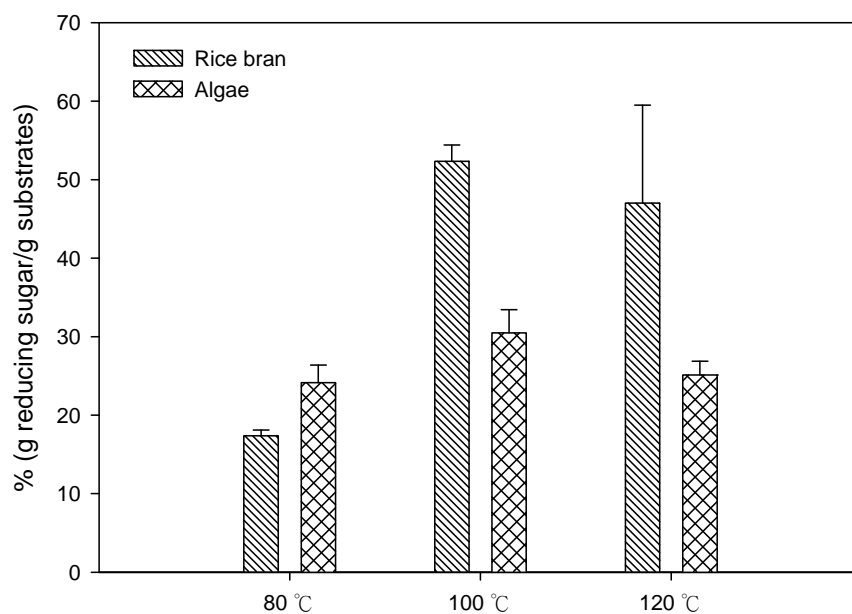


圖 4-4 不同反應溫度下對還原糖生成量之影響 (反應時間為 30 min; 使用之稀酸為鹽酸; 以米糠(0.5 g)為基質之稀酸濃度為 2% , 液態和固態比值 L/S=10、以綠藻粉(0.5 g)為基質之稀酸濃度為 5% , 液態和固態比值 L/S=10)

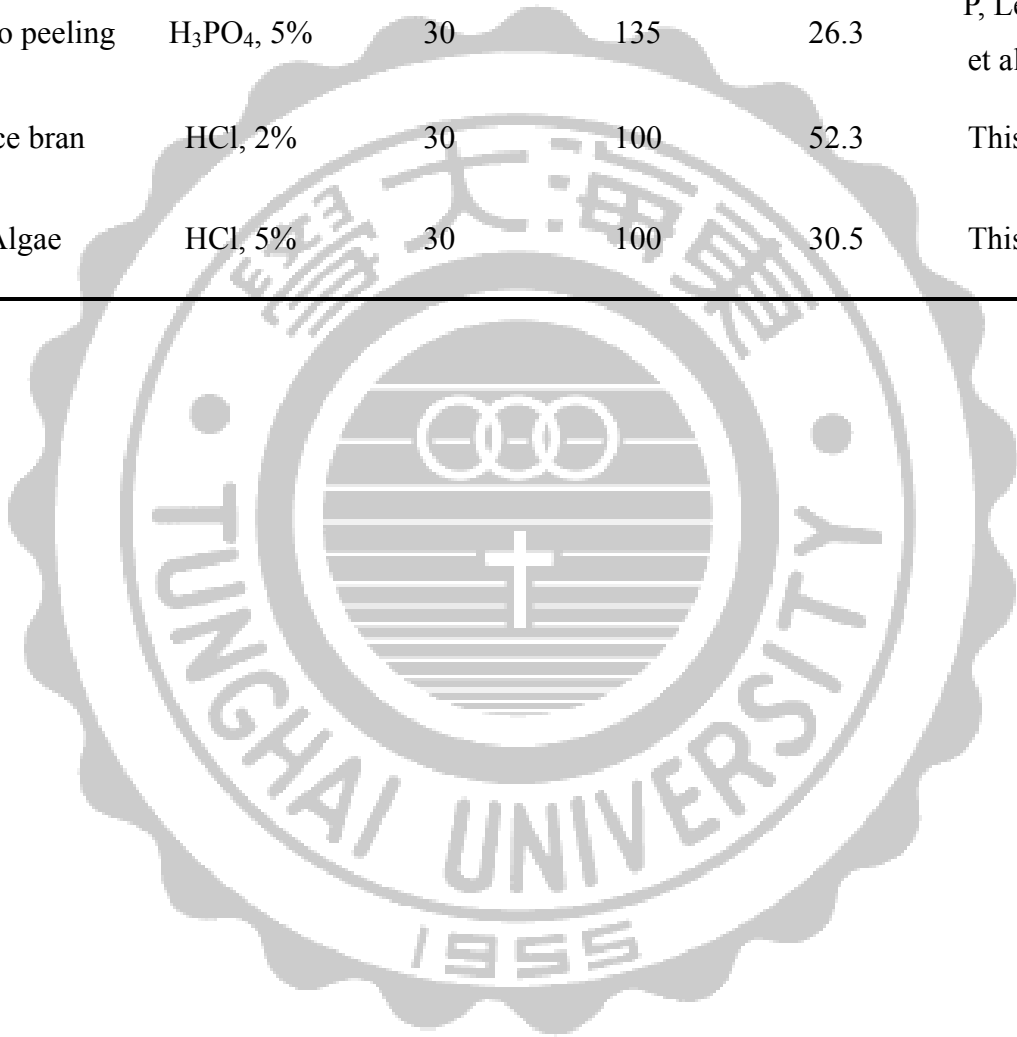
4.2.4 酸水解預處理之比較

由於木質素和半纖維素為五碳糖所組成，纖維素則多為六碳糖組成，因此要使用木質纖維素作為碳源培養微生物，必須水解纖維素部分，才可以得到較好菌體生長濃度，因為微生物大多為代謝六碳糖作為生長能量，影響生成六碳糖濃度之因素為基質纖維素組成和預處理時水解程度，因此欲得到較高濃度的六碳糖，得預處理水解半纖維素和木質素，再以酵素水解方式水解纖維素，根據文獻指出 (Agbor VB et al., 2011)，利用化學預處理方式，可以快速水解半纖維素和木質素，並且預處理得到還原糖濃度越高，表示水解程度越高，在第二階段酵素水解纖維素時，能得到較高濃度的葡萄糖。

表 4-2 為酸水解預處理在不同條件、基質下，得到最高的還原糖濃度之比較，使用 1% 的硫酸水解稻穀(劉, 2008)，可得到還原糖生成率為 35.5%；使用 1% 磷酸水解馬鈴薯皮 (P, Lenihan, et al., 2010)，可得到還原糖生成率為 26.32%。本次實驗所得到最佳結果分別為使用 2% 鹽酸水解米糠、5% 鹽酸水解綠藻粉，分別可得到還原糖生成率為 52.3%、30.5%，可能原因為米糠成分中所含之纖維素濃度較高，因此使用此種木質纖維素作為基質培養微生物是不錯的選擇。

表 4-2 酸水解預處理之比較

Substrate	Dilute acid	Heated time (min)	Temperature (°C)	Reducing sugar (%, g/g)	Reference
Rice husk	H ₂ SO ₄ , 1%	60	121	35.5	劉, 2008
Potato peeling	H ₃ PO ₄ , 5%	30	135	26.3	P, Lenihan, et al.,2010
Rice bran	HCl, 2%	30	100	52.3	This study
Algae	HCl, 5%	30	100	30.5	This study



4.3 搖瓶批次發酵實驗 (flask experiment)

4.3.1 培養時間之影響

本次實驗探討培養時間對於 *R.glutinis* 生長及累積油脂之影響。每 12 hr 取樣一次，實驗結果如圖 4-5 與表 4-3 所示，每次取樣測量菌體濃度、pH 濃度、剩餘還原糖濃度，並且於最後取樣點測量油脂累積濃度。在 12 hr 時得到菌體濃度為 3.1 g/l，發酵液中 pH 值下降至 4.4，剩餘還原糖濃度為 23.9 g/l；24 hr 後得到菌體濃度為 5.7 g/l，發酵液中 pH 值下降至 3.4，剩餘還原糖濃度為 14.5 g/l；36 hr 後得到菌體濃度為 8.9 g/l，發酵液中 pH 值下降至 2.6，剩餘還原糖濃度為 4.9 g/l；48 hr 後得到菌體濃度 9.5 g/l，發酵液中 pH 值為 2.4，剩餘還原糖濃度為 1.2 g/l，與文獻 (Bong Kyun Kim, et al., 2004) 所獲得之結果一致，發酵液中 pH 值會隨培養時間增長從起始 5.5 迅速下降至 2 左右，將會影響菌體生長與累積油脂，因此後續實驗將固定培養時間在 48 hr 之內，進行搖瓶實驗。

而搖瓶實驗中碳源為纖維水解液(核能所提供)的濃度之變化，也會影響到菌體生長及累積油脂，於 48 小時，碳源耗盡之後，*R.glutinis* 生長達持平，最高菌體濃度為 9.5 g/l，生長速率(productivity)為 1.98 g/l hr。

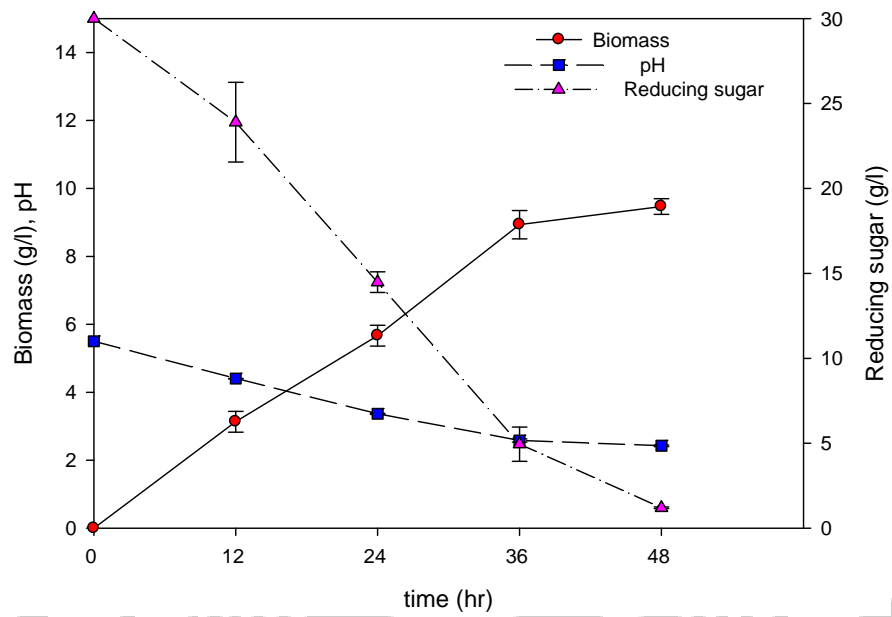


圖 4-5 Timing course 對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-3 不同培養時間對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

Time (hour)	Biomass (g/l)	Final pH	Reducing sugar (g/l)	Lipid content (% w/w)
0	0	5.5	30	
12	3.1 ± 0.31	4.4	23.9 ± 2.5	14.3 ± 0.02
24	5.7 ± 0.31	3.4	14.5 ± 0.6	17.2 ± 0.01
36	8.9 ± 0.42	2.6	4.9 ± 0.1	12.5
48	9.5 ± 0.23	2.4	1.2 ± 0.05	10.1

4.3.2 不同碳源之影響

本次實驗探討不同碳源(葡萄糖、純甘油、粗甘油、木糖、纖維水解液、米糠水解液)對於 *R.glutinis* 生長及累積油脂之影響。實驗結果如圖 4-6 與表 4-4 所示,以米糠水解液和葡萄糖為碳源有最高之菌體濃度,分別約為 10.3 g/l 及 9.4 g/l,其次是以核能所提供之纖維水解液和粗甘油為碳源,分別約為 8.8 g/l 及 8.2 g/l,最差的是木糖為碳源僅約為 5.4 g/l 之菌體濃度。由此結果顯示,雖然 *R.glutinis* 的菌體濃度產量較低,但此株菌體是可以分解並且利用五碳糖,此一顯示對於之後使用纖維水解液是正向的;在菌體累積油脂方面,則是以粗甘油為碳源有較高油脂含量,約佔細胞乾重的 46%,依序為純甘油(32.6%)、葡萄糖(25%)、木糖(17.8%)、纖維水解液(10.7%)、米糠水解液(7.6%),據文獻指出(Silvia Galafassia et al., 2012),水解液油脂累積會較低的原因為水解液中含有乙酸和糠醛,這兩種抑制物會影響菌體油脂累積。由本次實驗結果可知,以粗甘油為碳源,較能有效累積油脂,但以水解液為碳源可得到較高菌體濃度,因此之後實驗會採取水解液和粗甘油碳源混合做培養。

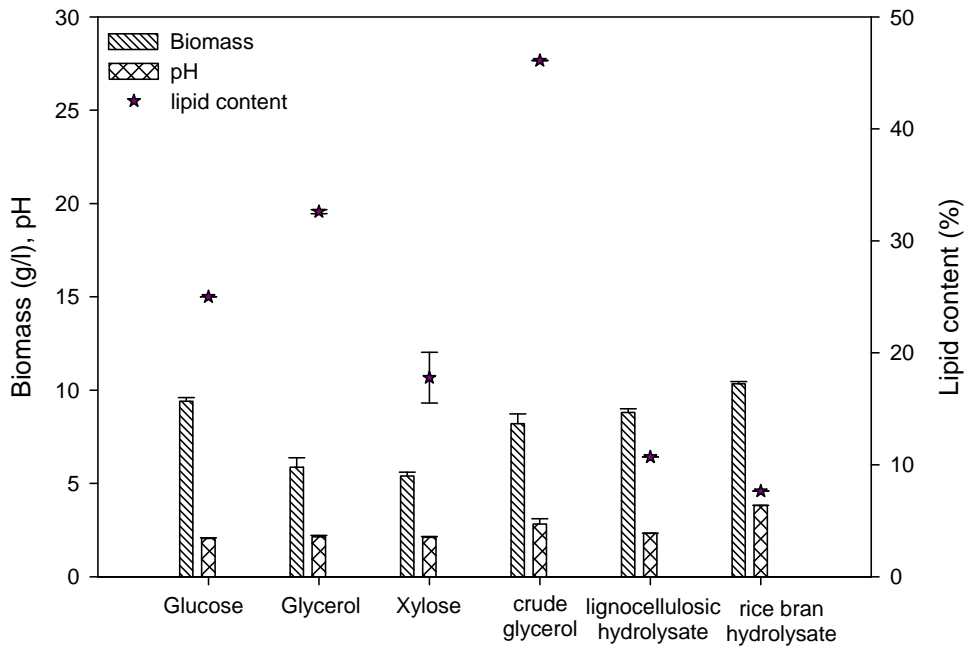


圖 4-6 不同碳源對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響(碳源濃度為 30 g/l)

表 4-4 不同碳源(30 g/l)對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響(碳源濃度為 30 g/l)

Carbon Source	Biomass (g/l)	Final pH	Lipid content (% w/w)
Glucose	9.4±0.2	2.1	25
Glycerol	5.9±0.5	2.1	32.6±0.2
Xylose	5.4±0.2	2.1	17.8±2.3
Crude glycerol	8.2±0.5	2.8	46.1
Lignocellulosichydrolysis	8.8±0.2	2.3	10.7
Rice branhydrolysis	10.3±0.1	3.8	7.6

4.3.3 碳源濃度之影響

本次實驗以核能所提供的纖維水解液做為碳源，將探討不同起始纖維水解液之還原糖(30、60、90、120 g/l)對於 *R.glutinis* 生長及累積油脂之影響。實驗結果如圖 4-7、表 4-5 所示，以起始還原糖濃度 30 g/l 下所獲得個數據分別與 60 g/l、90 g/l、120 g/l 做比較時，可以發現起始還原糖濃度 60 g/l 可得到最高的菌體濃度和油脂含量，剩餘還原糖量約為 30 g/l，其原因為 pH 降低，導致碳源無法繼續利用，而隨著還原糖濃度越來越高，菌體濃度則相對較低，此結果與(Silvia Galafassia et al.,2012)相同，文獻指出，過多的糠醛(Furural)與乙酸(acetic acid)，會抑制酵母菌生長，因此，將固定還原糖濃度為 30 g/l 來作為後續搖瓶實驗之探討，而提高碳源之還原糖濃度至 60 g/l，將會利用發酵槽系統，在控制 pH 的情況下，來進行更有效率的研究。

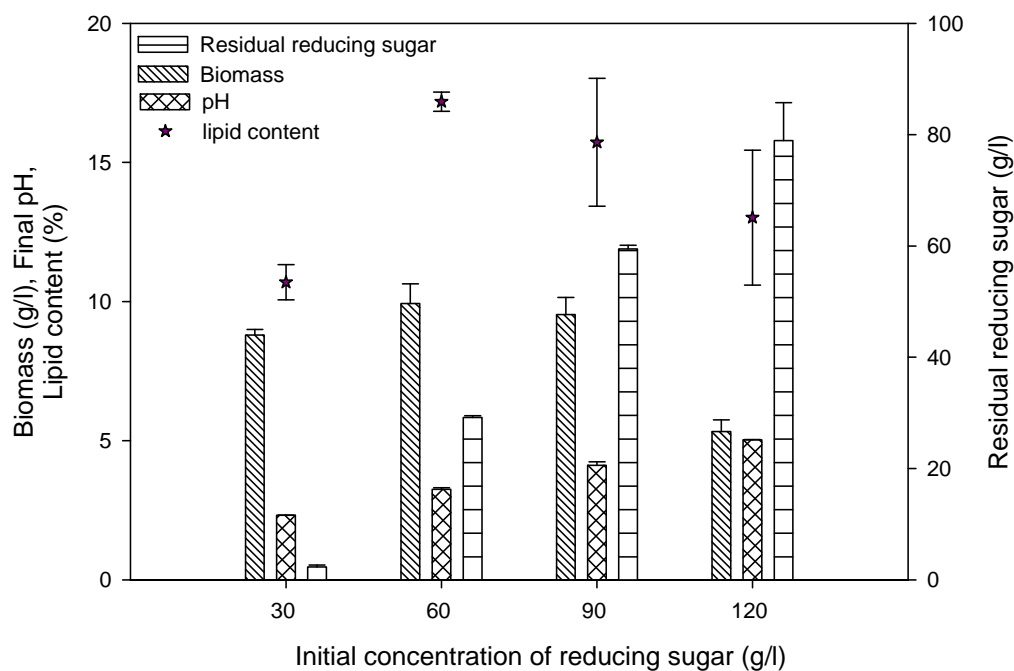


圖 4-7 不同起始還原糖濃度對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

表 4-5 不同木質纖維水解液還原糖濃度對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響

Initial concentration of reducing sugars (g/l)	Biomass (g/l)	Final pH	Residual reducing sugar (g/l)	Lipid content (% w/w)
30	8.8±0.2	2.3	2.3±0.4	10.7±0.6
60	9.9±0.7	3.3	29.2±0.3	17.2±0.3
90	9.5±0.6	4.1	59.4±0.7	15.7±2.3
120	5.3±0.4	5.0	78.9±6.8	13.0±2.4

4.2.4 有機氮源濃度之影響

本次實驗探討不同起始有機氮源(Yeast extract)濃度(0 g/l、0.5 g/l、1 g/l、2 g/l)對於 *R.glutinis* 生長及油脂累積之影響。文獻利用 RSM 最佳化培養基濃度中指出，添加硫酸銨((NH₄)₂SO₄)濃度為 2 g/l 作為氮源時，可得到油脂含量和類胡蘿蔔素產量分別增加了大約 1.4-1.5 倍 (Chanika Saengea et al.,2011)，而碳氮比(C/N)會影響微生物之油脂累積，因此本次實驗控制有機氮源的濃度，實驗結果如下圖 4-8、表 4-6 所示，隨著起始有機氮源濃度增加(0 g/l 提升至 2 g/l)，菌體濃度分別為 8.1、8.3、8.6、9.2 g/l，油脂含量分別為 10.6%、10.0%、11.5%、11.2%，差異性不大，由此可推斷有機氮源濃度的提升對於 *R.glutinis* 累積油脂與菌體生長影響極小，添加有機氮源成本與之不符合，所以之後實驗將不添加有機氮源。

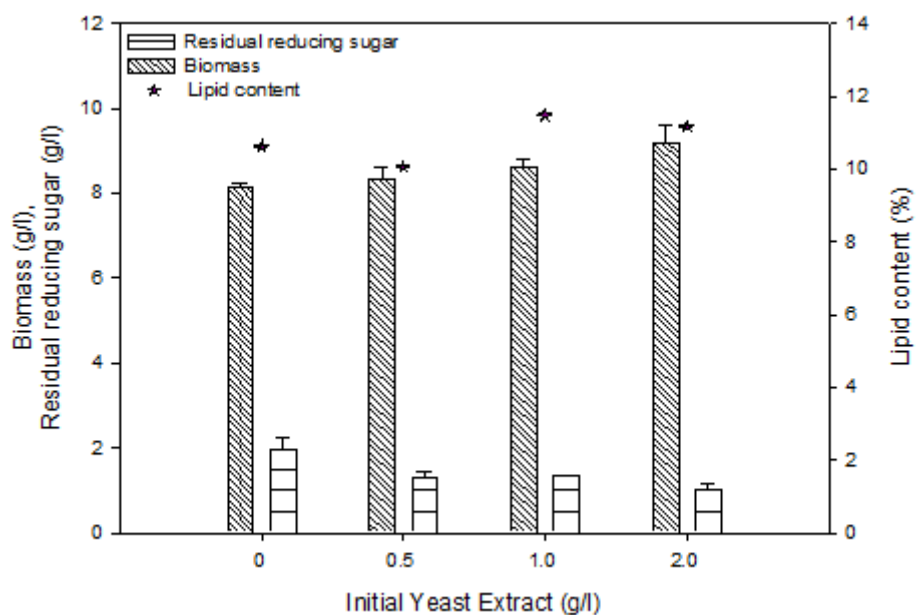


圖 4-8 不同起始有機氮源濃度對 *R. glutinis* 生長與累積油脂的影響

表 4-6 不同起始有機氮源濃度對 *R. glutinis* 生長與累積油脂的影響

Initial concentration of Yeast extract. (g/l)	Biomass (g/l)	Final pH	Residual reducing sugar (g/l)	Lipid content (% w/w)
0	8.1±0.1	2.3	2.0±0.3	10.6
0.5	8.3±0.3	2.3	1.3±0.2	10.0
1.0	8.6±0.2	2.4	1.3	11.5
2.0	9.2±0.4	2.4	1.0±0.2	11.2

4.3.5 混合碳源之影響

本實驗探討混合碳源的比例(0、1/6、1/3、2/3、1)對於 *R.glutinis* 的生長與累積油脂之影響。使用木質素纖維水解液，由於含有抑制物導致油脂較不亦累積 (Guochang Zhang et al.,2011)，因此利用混合粗甘油作為碳源，增加菌體油脂累積含量(Chanika Saengea et al.,2011)，根據文獻指出，由於粗甘油裡含有微量元素，可提升油脂累積量，實驗結果如圖 4-9、表 4-7 所示，隨著木質纖維素和粗甘油比例分別為 0、1/6、1/3、2/3、1，菌體濃度分別為 8.8、9.2、9.6、9.5、10.5 g/l，油脂累積含量分別為 10.7、28、33.7、35.1、31.6%，隨著添加粗甘油濃度比例上升，可以得到比較高的菌體濃度和油脂累積含量，此部分與文獻數據吻合，但隨著添加粗甘油濃度比例增加至 1:1 時，油脂累積含量會下降，這種現象的產生，其可能因素為 pH 降太低，會影響油脂累積含量，因此在探討放大培養-5 L 發酵槽系統中，將利用還原糖濃度 30 g/l 混合粗甘油濃度 30 g/l 作為探討，在控制 pH 的情況下，來進行更有效之研究。

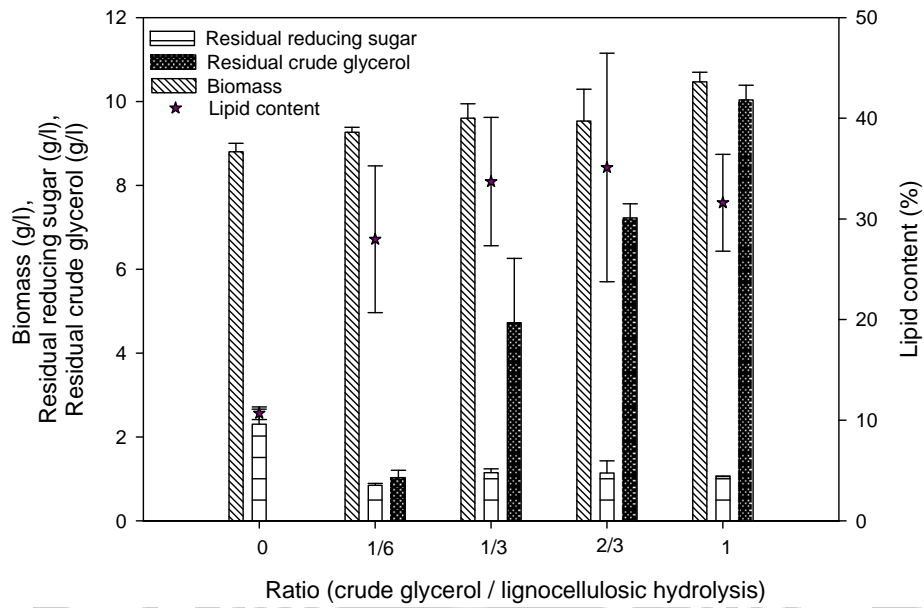


圖 4-9 不同混合碳源比例對 *R. glutinis* 的生長及累積油脂之影響 (總共碳源濃度為 30 g/l)

表 4-7 不同混合碳源比例對 *R. glutinis* 的生長及累積油脂之影響(總共碳源濃度為 30 g/l)

Ratio	Biomass (g/l)	Final pH	Residual reducing sugar (g/l)	Residual crude glycerol (g/l)	Lipid content (% w/w)
0	8.8±0.2	2.3	2.3±0.4	0	10.7±0.6
1/6	9.2±0.1	2.4	0.8	1.0±0.2	28.0±7.0
1/3	9.6±0.3	2.4	1.2±0.1	4.7±1.5	33.7±6.4
2/3	9.5±0.8	2.5	1.1±0.3	7.2±0.3	35.1±11.4
1	10.5±0.2	2.4	1.1	10.0±0.3	31.6±4.8

4.4 發酵槽批次程序

4.4.1 攪拌式發酵槽批次程序

攪拌式發酵槽此類型反應器具有機械式攪拌葉片、進氣管口於槽體底部，藉由葉片的機械攪拌，由底部進入槽體的氣體能與流體在整個系統中均勻混和，混和性佳、高質傳能力、高剪切力等，是攪拌式發酵槽最主要的優點，為目前工業上應用最廣泛的反應槽型。

由搖瓶實驗可知，核能所提供之纖維水解液還原糖濃度在 60 g/l 培養時，水解液裡的抑制物對菌體產生之抑制作用小，菌體生成量最高，因此，本次實驗將探討以纖維水解液之還原糖濃度在 60 g/l 下在攪拌式發酵槽中，對於 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響。由實驗結果如圖 4-10、表 4-8 所示，最大菌體濃度為 20.2 g/l，菌體最大生長速率(=菌體濃度/發酵時間)達 0.13 g/l/hr，平均油脂含量(=油脂重量/菌體重量)為 $23.5 \pm 2.4\%$ ，最大油脂生產速率(=油脂濃度/發酵時間)為 0.03 g/l/hr，油脂產率(=生成油脂濃度/消耗還原糖濃度)為 0.08，和文獻 (Zhiyong, 2011) 以葡萄糖濃度 60 g/l 為碳源，所得的最大菌體濃度 29.8 g/l，油脂產率為 0.2，有頗大差異，可能因為抑制物糠醛(furural)與乙酸(acetic acid)會抑制油脂生成，雖然產率偏低，但有實驗價值，因為所使用的碳源成本低，可以用於大量生產。

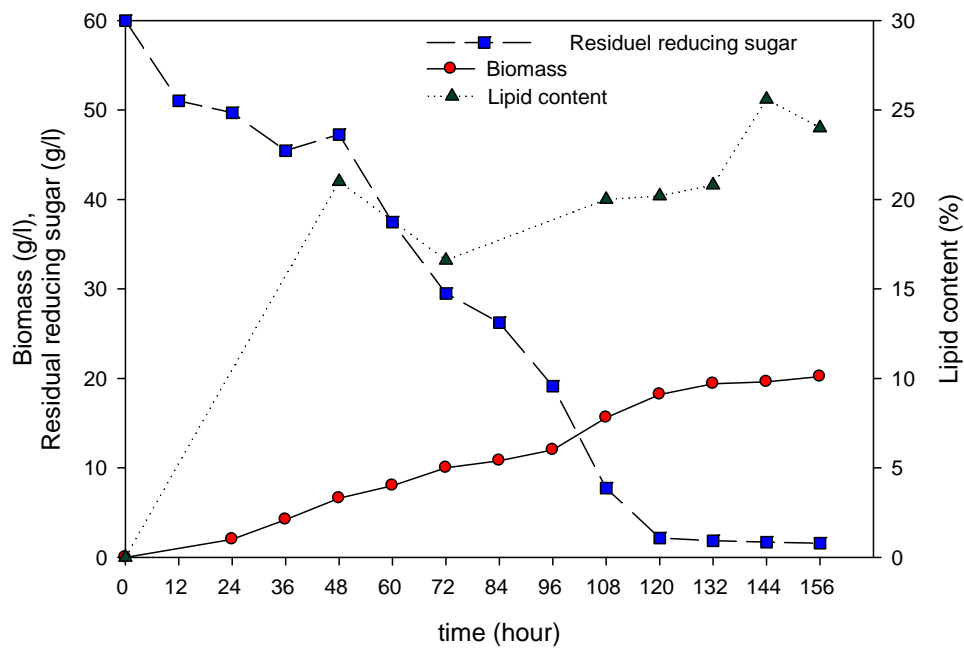


圖 4-10 纖維水解液的發酵策略下，*R. glutinis* 的生長之變化

表 4-8 纖維水解液在批次策略下 *R. glutinis* 的生長及累積油脂之影響

Carbon source	Max. biomass (g/l)	Max. growth rate (g/l/hr)	Average lipid content (% w/w)	Max. total lipids (g/l)	Yield* (g/g)	Max. lipid productivity (g/l/hr)
Lignocellulosic hydrolysate (60 g/l)	20.2	0.13	23.5±2.4	4.7	0.08	0.03

*Lipid produced per straw hydrolysate consumed

4.4.2 氣舉式發酵槽批次培養

4.4.2.1 不同通氣量之影響

透過管線導入氣體，使氣體在氣舉式發酵槽內對流，帶動菌體循環，本次實驗探討不同通氣量對 *R.glutinis* 生長及油脂累積之影響。為了減少能量消耗，因此本次實驗利用氣舉式發酵槽取代攪拌式發酵槽做培養，利用核能所提供之纖維水解液之還原糖濃度為 60 g/l，在通氣量為 1 vvm、2 vvm 下，培養至菌體濃度達穩定平衡，實驗結果如圖 4-11、圖 4-12 與表 4-9 所示，在通氣量為 1 vvm、2 vvm 下，其平均油脂含量分別為 26.1%、34.8%；其最大菌體濃度分別為 11 g/l、21.2 g/l；其最大油脂生產速率分別為 0.02、0.07 g/l/hr。

由圖 4-13、圖 4-14 可得知，通氣量為 2 vvm 時生長速率及累積油脂較快。與攪拌式發酵槽比較，同樣在通氣量在 1 vvm 時，攪拌式發酵槽可得平均油脂為 23.5%；其最大菌體濃度為 20.2 g/l；其最大油脂生產速率為 0.03 g/l，與氣舉式發酵槽做比較，可以得知最大菌體濃度在攪拌式發酵槽中比較高，在相同的通氣量下，透過攪拌可以得到比較大的溶氧量，因此最大菌體濃度會比氣舉式發酵槽高，但由於攪拌式發酵槽比氣舉式發酵槽耗費能量，成本也比較高，因此本次實驗通過利用提高氣舉式發酵槽的通氣量，取代攪拌式發酵槽，依實驗結果所示，提高通氣量，會得到更高的菌體濃度和最大油脂生長速度，因此之後實驗，都選用氣舉式發酵槽在通氣量 2 vvm 下探討對 *R.glutinis* 生長及累積油脂之影響。

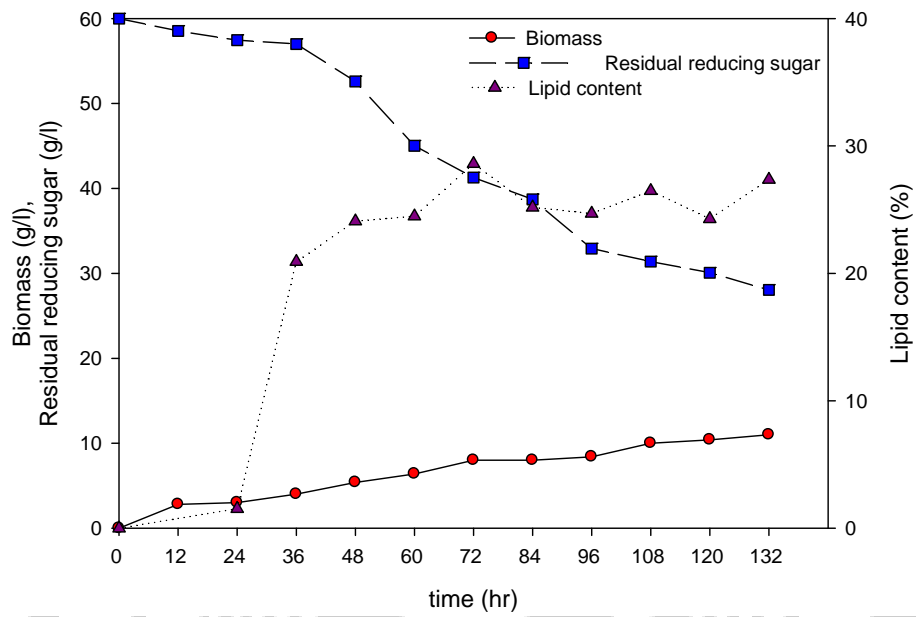


圖 4-11 在通氣量 1 vvm 氣舉式發酵槽，*R. glutinis* 生長之影響

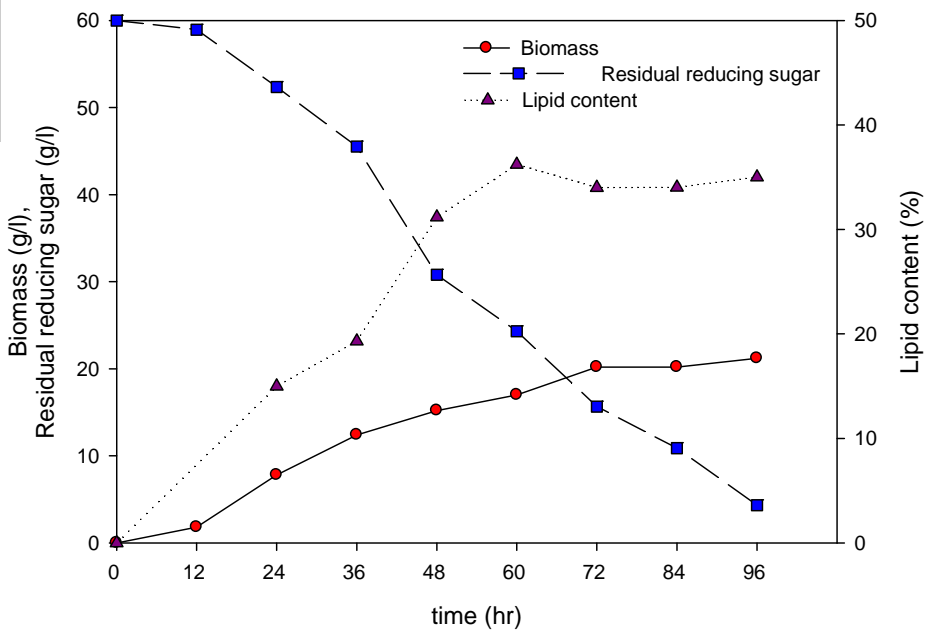


圖 4-12 在通氣量 2 vvm 氣舉式發酵槽，*R. glutinis* 生長之影響

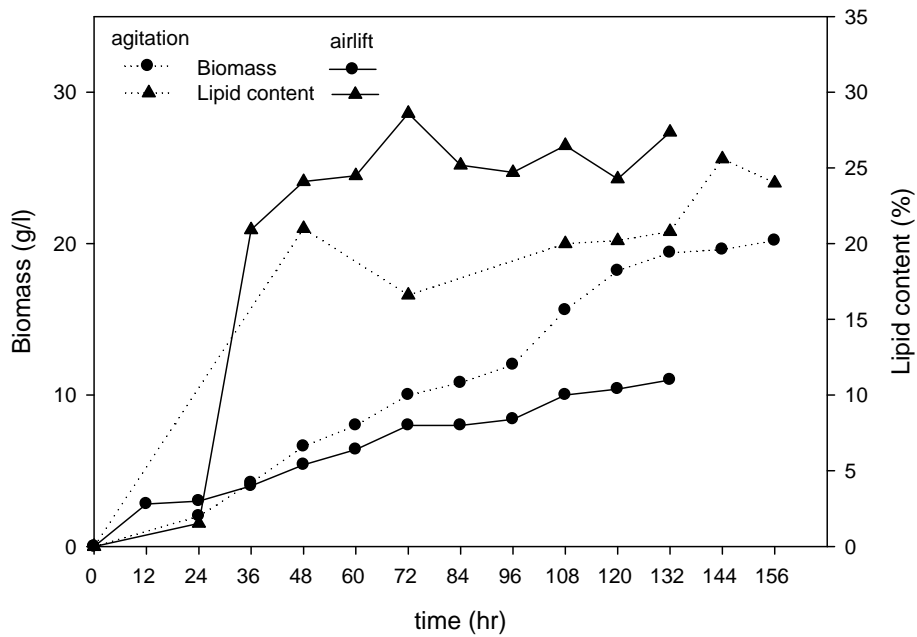


圖 4-13 比較不同發酵槽對 *R. glutinis* 生長之影響

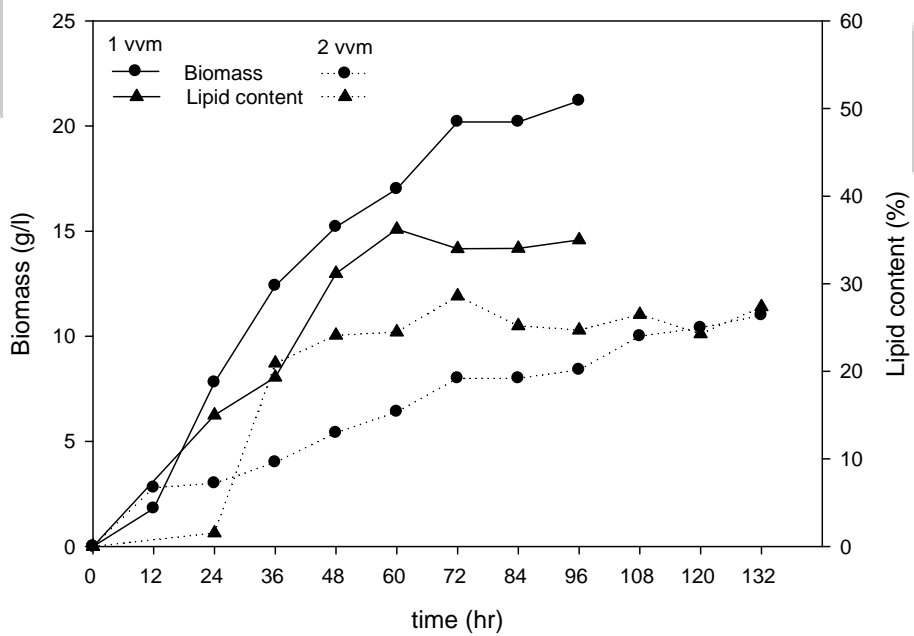


圖 4-14 比較不同通氣量在氣舉式發酵槽對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-9 不同通氣量在氣舉式發酵槽對 *R.glutinis* 的生長與累積油脂之影響

Aeration (vvm)	Max. biomass (g/l)	Max. growth rate (g/l/hr)	Average lipid content (%, w/w)	Max. total lipids (g/l)	Yield* (g/g)	Max. lipid productivity (g/l/hr)
1	11	0.08	26.1±1.7	2.9	0.13	0.02
2	21.2	0.22	34.8±1.0	7.4	0.13	0.07

*Lipid produced per straw hydrolysate consumed



4.4.2.2 不同碳源之影響

本次實驗探討不同碳源在氣舉式發酵批次程序下對 *R.glutinis* 生長及累積油脂之影響。由於木質素纖維水解液中含有抑制物，會抑制菌體生長及油脂累積，因此利用工業廢棄物-粗甘油和木質素纖維水解液之混合碳源培養 *R.glutinis*，由搖瓶實驗中可發現，混合碳源-木質素纖維水解液和粗甘油比為 1:1 時，可得最大菌體濃度和最大油脂含量，因此採取使用木質素纖維水解液和粗甘油分別各 30 g/l 的碳源濃度做培養，並且比較核能所提供之纖維水解液、米糠水解液、綠藻水解液分別與粗甘油混合對 *R.glutinis* 生長及累積油脂之影響。

實驗結果如圖 4-15、圖 4-16、圖 4-17、圖 4-19、表 4-10 所示，粗甘油混合纖維水解液、米糠水解液、螺旋藻水解液為碳源，分別可得平均油脂含量 51.5%、42.5%、42.3%；其最大菌體濃度分別為 21.6、22、20.6 g/l，其最大油脂生產速率分別為 0.12、0.10、0.09 g/l/hr。由圖 4-18 所示，可得知以純纖維水解液作為碳源和纖維水解液混合粗甘油作為碳源之平均油脂含量分別為 34.8%、51.5%，混合碳源有較佳的油脂累積。

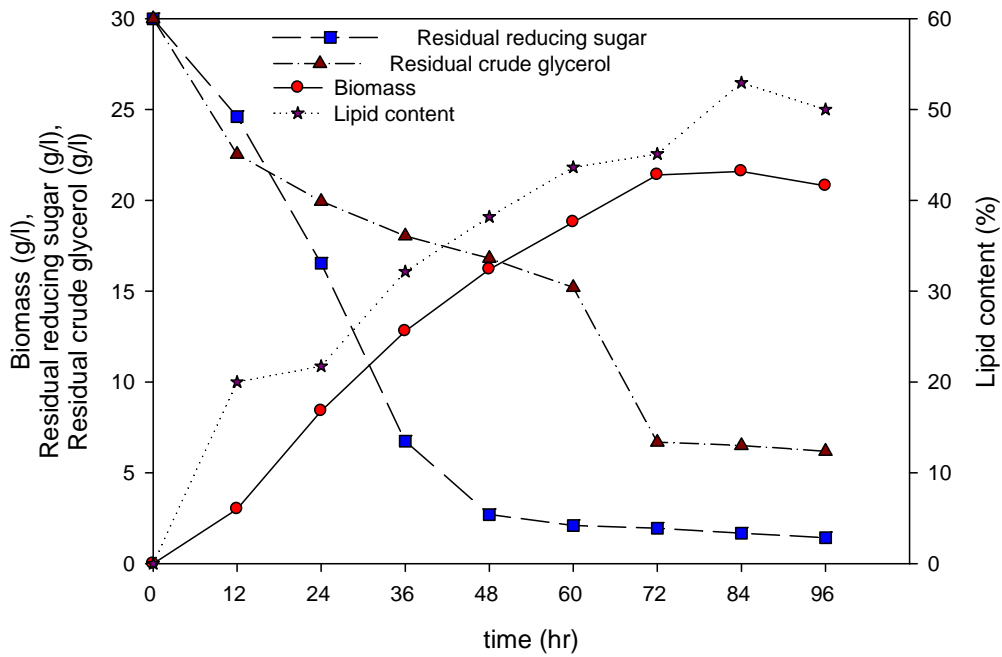


圖 4-15 核能所提供之纖維水解液和粗甘油之混合碳源對 *R. glutinis* 生長之影響

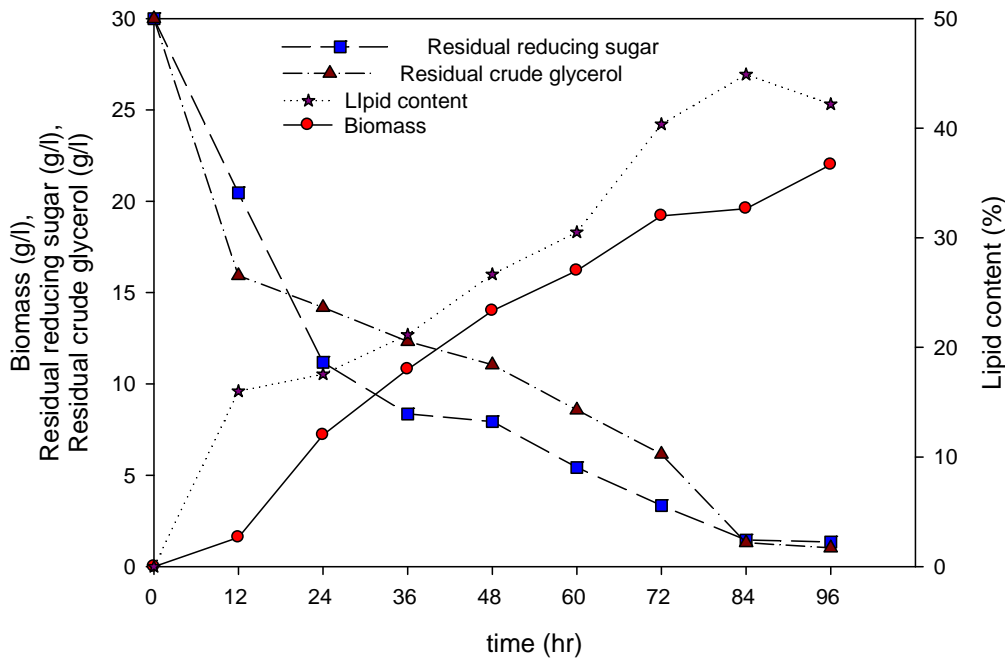


圖 4-16 米糠水解液和粗甘油之混合碳源對 *R. glutinis* 生長之影響

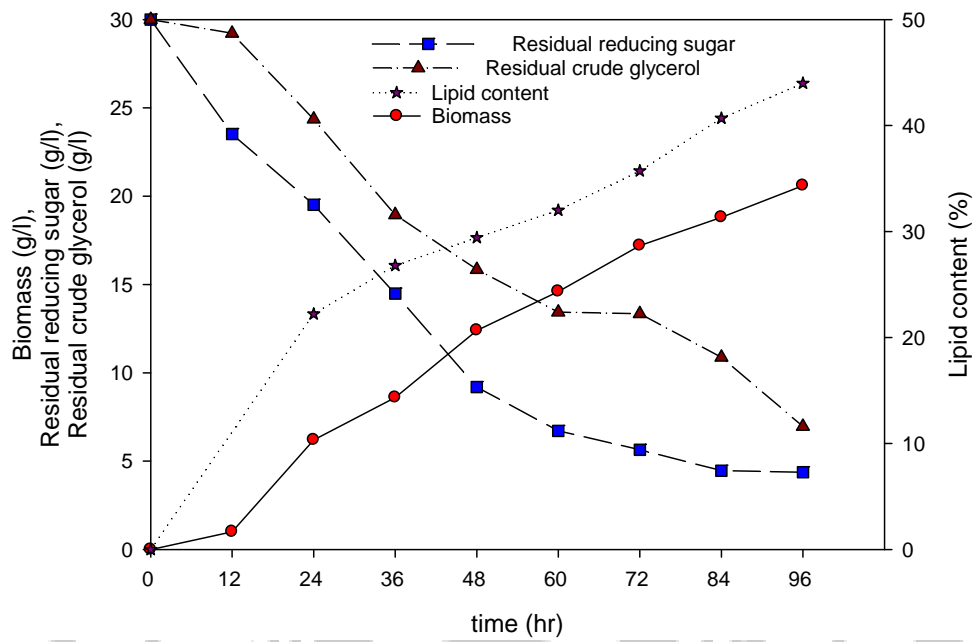


圖 4-17 螺旋藻水解液和粗甘油之混合碳源對 *R. glutinis* 生長之影響

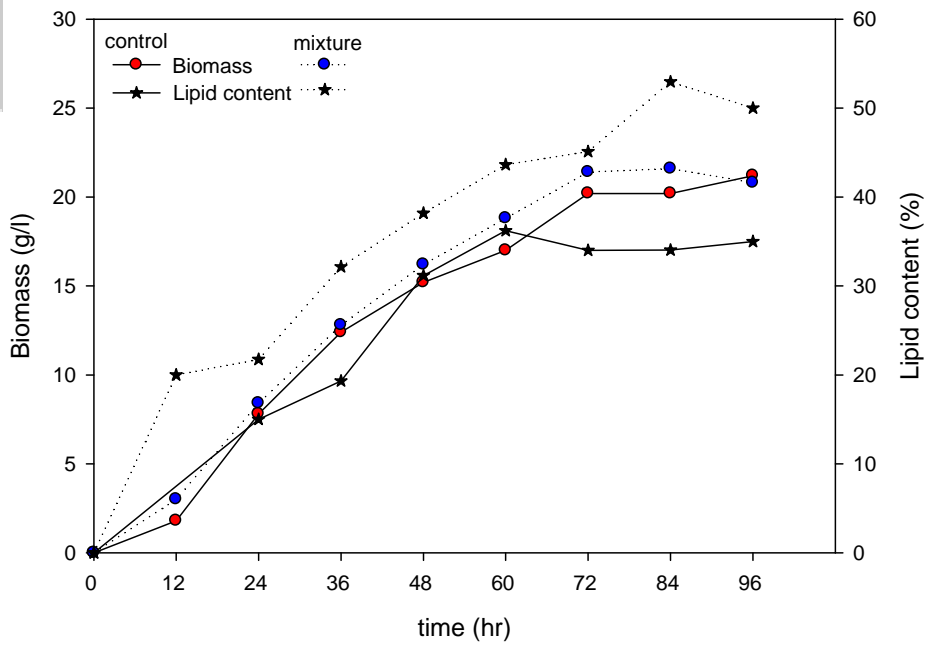


圖 4-18 比較混合碳源和純碳源對 *R. glutinis* 生長之影響

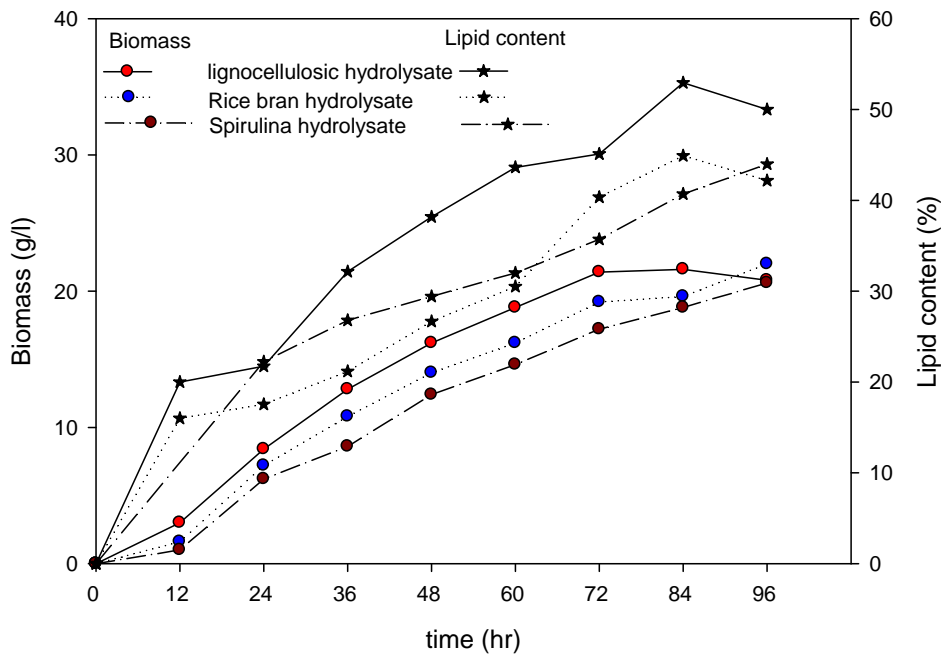


圖 4-19 不同木質素纖維水解液混合粗甘油對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-10 不同木質素纖維水解液混合粗甘油對 *R. glutinis* 生長及累積油脂之影響(碳源濃度為 60 g/l)

Carbon source mixture crude glycerol	Max. biomass (g/l)	Max. growth rate (g/l/hr)	Average lipid content (% w/w)	Max. total lipids (g/l)	Yield* (g/g)	Max. lipid productivity (g/l/hr)
lignocellulosic hydrolysate	21.6	0.23	51.5±2.1	11.1	0.21	0.12
Rice bran hydrolysate	22.0	0.23	42.5±2.3	9.4	0.16	0.10
Algae hydrolysate	20.6	0.21	42.3±2.3	8.7	0.18	0.09

*Lipid produced per straw hydrolysate consumed

4.5 發酵策略的比較

表 4-11 為各發酵策略之動力學參數整理，纖維水解液在攪拌式發酵槽和氣舉式發酵槽中的實驗中，氣體進氣量為 1 vvm 時，以攪拌式發酵槽可得到較佳的結果。推測原因是攪拌式發酵槽可利用葉片的機械攪拌，提供對數生長期時所需要的高溶氧，但攪拌式發酵槽所需耗費能量較高，因此提高氣舉式發酵槽的進氣量，提高氣體在內導流管的導流作用，使得內部的氣體與其帶動之流體在反應槽中能形成穩定的迴路流動，藉此方式提高細胞生長速率(0.22 g/l/hr)且較高的菌體數(21.2 g/l)，之後再透過利用混合碳源的方式，促使細胞累積油脂(51.5%)，且提高了整體油脂生產速率(0.12 g/l/hr)。利用各種不同木質纖維水解液和粗甘油混合作為培養 *R. glutinis* 的碳源，可以發現核能所提供的纖維水解液油脂累積速率較高，可能因素為核能所提供的纖維水解液中的糠醛含量較低(0.20 g/l)，而綠藻水解液中，含有太多的乙酸和糠醛，抑制了細胞累積油脂。

表 4-12、表 4-13 為文獻中 *R. glutinis* 在不同低成本之碳源與本研究之成果的油脂含量比較。由比較結果可以得知，本研究之菌體總油脂生產速率高於文獻結果許多，推測原因在於碳源提供，由於粗甘油中含有微量元素能幫助菌體油脂累積但其菌體生長速率比較慢，而木質纖維水解液雖然油脂含量相比較低，但其生長速率比較快，因此本實驗利用混合碳源，結合兩者優點，提升細胞整體油脂生產速率。

表 4-14、表 4-15 為文獻中各種產油維生素在不同低成本之碳源與本研究之成果油脂含量比較。由比較結果可以得知，*Rhodotorula glutinis* 是一株高油脂酵母菌，比其他微生物更容易累積油脂，並且利用混合碳源方式得到最高生長速率。

表 4-11 各實驗之動力學參數比較

Fermentation Strategy	Max. biomass (g/l)	Max. growth rate (g/l/hr)	Average lipid content (% w/w)	Max. total lipids (g/l)	Yield* (g/g)	Max. lipid productivity (g/l/hr)
Agitation						
fermenter-lignocellulosic hydrolysate (60 g/l)	20.2	0.13	23.5±2.4	4.7	0.08	0.03
Airlift- lignocellulosic hydrolysate (1 vvm, 60 g/l)	11	0.08	26.1±1.7	2.9	0.13	0.02
Airlift- lignocellulosic hydrolysate (2 vvm, 60 g/l)	21.2	0.22	34.8±1.0	7.4	0.13	0.07
Airlift- lignocellulosic hydrolysate and crude glycerol (2 vvm, 60 g/l)	21.6	0.23	51.5±2.1	11.1	0.21	0.12
Airlift- Rice bran hydrolysate and crude glycerol (2 vvm, 60 g/l)	22.0	0.23	42.5±2.3	9.4	0.16	0.10
Airlift- Algae hydrolysate and crude glycerol (2 vvm, 60 g/l)	20.6	0.21	42.3±2.3	8.7	0.18	0.09

*Lipid produced per straw hydrolysate consumed

表 4-12 *Rhodotorula glutinis* 在不同低成本之碳源下的油脂含量比較 (I)

Microorganisms	Carbon source	Biomass (g/l)	Lipid content (% w/w)	Reference
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Wheat straw acid hydrolysate	13.8	25.0	Yu, et al. (2011)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Monosodium glutamate wastewater	25.0	22.0	Xue, et al. (2008)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Crude glycerol	25.4	50.2	Yi Xian Liu. (2014)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Lignocellulosic enzymatic hydrolysate and crude glycerol	21.6	51.5	This study
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Rice bran enzymatic hydrolysate and crude glycerol	22.0	42.5	This study
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Algae enzymatic hydrolysate and crude glycerol	20.6	42.3	This study

表 4-13 *Rhodotorula glutinis* 在不同低成本之碳源下的油脂含量比較 (II)

Microorganisms	Carbon source	Total lipids (g/l)	lipid productivity (g/l/hr)	Reference
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Wheat straw acid hydrolysate	3.5	0.02	Yu, et al. (2011)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Monosodium glutamate wastewater	5.0	0.04	Xue, et al. (2008)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Crude glycerol	12.8	0.11	Yi Xian Liu. (2014)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Lignocellulosic enzymatic hydrolysate and crude glycerol	11.1	0.12	This study
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Rice bran enzymatic hydrolysate and crude glycerol	9.4	0.10	This study
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Algae enzymatic hydrolysate and crude glycerol	8.7	0.09	This study

表 4-14 各種產油微生物在不同低成本之碳源下的油脂含量比較 (III)

Microorganisms	Carbon source	Biomass (g/l)	Lipid content (% w/w)	Reference
<i>Mortierella isabellina</i>	Rice hull acid hydrolysate	5.6	64.3	Economou, et al. (2011)
<i>Trichosporon fermentans</i>	Rice straw acid hydrolysate	28.6	40.1	Chao Husang, et al. (2009)
<i>Trichosporon cutaeum</i>	Corn stover enzymatic hydrolysate	19.3	39.2	Huang X., et al. (2011)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Industrial fat	8.7	44.0	Papanikolaou et al. (2001)
<i>Mortierella isabellina</i>	Glycerol	6.2	53.2	Fakas, et al. (2009)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Sewage sludge	9.4	68.0	Angerbauer, et al. (2008)
<i>Mucor sp. RRL001</i>	Tapioca starch	28.0	17.8	Ahmed, et al. (2006)
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Corn cob acid hydrolysate	22.9	35.9	Xue-Fang Chen, et al. (2013)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Lignocellulosic enzymatic hydrolysate and crude glycerol	21.6	51.5	This study
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Rice bran enzymatic hydrolysate and crude glycerol	22.0	42.5	This study
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Algae enzymatic hydrolysate and crude glycerol	20.6	42.3	This study

表 4-15 各種產油微生物在不同低成本之碳源下的油脂含量比較 (IV)

Microorganisms	Carbon source	Total lipids (g/l)	lipid productivity (g/l/hr)	Reference
<i>Mortierella isabellina</i>	Rice hull acid hydrolysate	3.6	0.01	Economou, et al. (2011)
<i>Trichosporon fermentans</i>	Rice straw acid hydrolysate	11.5	0.07	Chao Husang, et al. (2009)
<i>Trichosporon cutaeum</i>	Corn stover enzymatic hydrolysate	7.6	0.05	Huang X., et al. (2011)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Industrial fat	3.8	0.04	Papanikolaou et al. (2001)
<i>Mortierella isabellina</i>	Glycerol	3.3	0.01	Fakas, et al. (2009)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Sewage sludge	6.4	0.03	Angerbauer, et al. (2008)
<i>Mucor sp. RRL001</i>	Tapioca starch	5.0	0.03	Ahmed, et al. (2006)
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Corn cob acid hydrolysate	10.4	0.09	Xue-Fang Chen, et al. (2013)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Lignocellulosic enzymatic hydrolysate and crude glycerol	11.1	0.12	This study
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Rice bran enzymatic hydrolysate and crude glycerol	9.4	0.10	This study
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Algae enzymatic hydrolysate and crude glycerol	8.7	0.09	This study

第五章結論與未來展望

5.1 結論

由上章節討論中，所探討木質纖維水解液、木質纖維水解液混合粗甘油對 *R.glutinis* 之影響以及結果，整理出以下結論：

從水解部分可知，米糠還有大量木質纖維素，水解時可達到 52.3% 的還原糖，綠藻木質纖維素較少，水解時有 30.5% 的還原糖，並且因為全球每年殘留大量的木質纖維素，因此將此轉為菌體能使用的碳水化合物，不僅節省成本又可以達到資源永續利用的目的。

從搖瓶實驗可知，纖維水解液(核能所提供)可以提高菌體濃度達 8.8 ± 0.2 g/l，油脂含量為 10.7%；米糠水解液可提高菌體濃度達 10.3 ± 0.2 g/l，油脂含量為 7.6%；將木質纖維素混合粗甘油以 1:1 的比例混合，可提高菌體濃度至 10.5 ± 0.2 g/l，油脂含量可提升至 $31.6 \pm 4.8\%$ ，利用木質纖維水解液和粗甘油，由於兩項碳源來源都屬於廢棄物，因此不僅節省成本，又可以增加菌體濃度和油脂含量。

從發酵槽批次實驗由於可以控制酸鹼值，因此菌體得以在良好條件下生長，並且將木質纖維水解液(稻稈、米糠、綠藻)混合粗甘油之實驗結果可分別得到菌體濃度 21.6、22、20.6 g/l；油脂含量為 $51.5 \pm 2.1\%$ 、 $42.5 \pm 2.3\%$ 、 $42.3 \pm 2.3\%$ ，和米糠直接榨油可得到 14.6% 油脂含量，油脂含量提升了 2.9 倍，此結果顯示纖維水解液作為發酵 *R.glutinis* 之培養基的潛力。

5.2 未來展望

對於後續之研究，有以下幾點值得發展與探討：

首先，利用基因改植或菌種突變方式進行菌種改良，找出具備高油脂含量、高油脂生產速率之菌種；由於全球稻米收穫量甚大，因此利用稻殼、稻草水解液作為碳源培養菌體，是一項頗具潛力的研究；當菌體數量達到某一程度後，利用陶瓷過濾膜組過濾掉發酵液，再饋入高碳源濃度之培養基(不含氮源)，以促使細胞穩定累積油脂，進而提高整體油脂生產速率，最後可連接 *R.glutinis* 與藻類進行串聯培養，利用木質纖維水解液作為 *R.glutinis* 之碳源，將酵母菌產生之 CO_2 導入綠藻系統中，將綠藻產生之 O_2 釋放於空氣中，此系統不但可以減少 CO_2 的排放，還可以減少能源耗損和增加總油脂產量。

參考文獻

- 劉宏娟、張建安、墨玉欣、李建、周玉杰、程可可.(2008). 利用微生物油脂制備生物柴油. 化學反應工程與工藝,03:0263-0265.
- 洪志瑞.(2007). 油脂性微藻培養於新型光生化反應器之研究. 成功大學化學工程學系研究所碩士論文.
- 江建忠.(2008). 利用超臨界流體技術製備生質柴油之研究. 國立清華大學化學工程研究所碩士論文.
- 劉家宏.(2008). 探討稻殼酸水解液中有害物質的移除對 *Pichia stipitis* BCRC 21775 生產乙醇之影響. 國立中央大學化學工程與材料工程研究所碩士論文.
- 張志勇.(2011). 探討不同發酵策略對於 *Rhodotorula glutinis* 生長及累積油脂之影響. 私立東海大學化學工程暨材料學系研究所碩士論文.
- 余依嬛. (2012). 以工業廢棄物粗甘油與酒糟水作為培養基探討 *Rhodotorula glutinis* 的生長影響. 私立東海大學化學工程與材料工程研究所論文.
- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6), 675-685.
- Aksu, Z., & Eren, A. T. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, 40(9), 2985-2991.

Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., & Guebitz, G. M. (2008).

Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour Technol*, 99(8), 3051-3056.

Asante, N. D. K., & Zhu, X. X. (1996). An automated approach for heat exchanger network retrofit featuring minimal topology modifications. *Computers & Chemical Engineering*, 20, Supplement 1(0), S7-S12.

Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., & Kumar, S. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 91-106.

Cheirsilp, B., & Louhasakul, Y. (2013). Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. *Bioresour Technol*, 142, 329-337.

Chen, W. H., Pen, B. L., Yu, C. T., & Hwang, W. S. (2011). Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. *Bioresour Technol*, 102(3), 2916-2924.

Chen, X.-F., Huang, C., Yang, X.-Y., Xiong, L., Chen, X.-D., & Ma, L.-L. (2013). Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid

hydrolysate. *Bioresour Technol*, 143(0), 18-24.

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(4), 329-335.

Economou Ch, N., Aggelis, G., Pavlou, S., & Vayenas, D. V. (2011). Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. *Bioresour Technol*, 102(20), 9737-9742.

Fakas, S., Papanikolaou, S., Batsos, A., Galiotou-Panayotou, M., Mallouchos, A., & Aggelis, G. (2009). Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioenergy*, 33(4), 573-580.

Galafassi, S., Cucchetti, D., Pizza, F., Franzosi, G., Bianchi, D., & Compagno, C. (2012). Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresour Technol*, 111, 398-403.

Hernández-Almanza, A., Cesar Montanez, J., Aguilar-González, M. A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2014). *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*, 5, 64-72.

Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., & Tiffany, D. (2006). Environmental,

economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels.

Proc Natl Acad Sci U S A, 103(30), 11206-11210.

Huang, C., Zong, M. H., Wu, H., & Liu, Q. P. (2009). Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresour Technol*, 100(19), 4535-4538.

Huang, X., Wang, Y., Liu, W., & Bao, J. (2011). Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. *Bioresour Technol*, 102(20), 9705-9709.

Lee, J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, 56(1), 1-24.

Lenihan, P., Orozco, A., O'Neill, E., Ahmad, M. N. M., Rooney, D. W., & Walker, G. M. (2010). Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal*, 156(2), 395-403.

Li, Y., Zhao, Z., & Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(3), 312-317.

Liu, Z. L. (2011). Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90(3), 809-825.

- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, 96(6), 673-686.
- Orozco, A., Ahmad, M., Rooney, D., & Walker, G. (2007). Dilute Acid Hydrolysis of Cellulose and Cellulosic Bio-Waste Using a Microwave Reactor System. *Process Safety and Environmental Protection*, 85(5), 446-449.
- Panagiotopoulos, I. A., Lignos, G. D., Bakker, R. R., & Koukios, E. G. (2012). Effect of low severity dilute-acid pretreatment of barley straw and decreased enzyme loading hydrolysis on the production of fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. *Journal of Cleaner Production*, 32, 45-51.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, 86(11), 807-815.
- Ratledge, C., & Wynn, J. P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology* (Vol. Volume 51, pp. 1-51): Academic Press.
- Romero, I., Ruiz, E., Castro, E., & Moya, M. (2010). Acid hydrolysis of olive tree biomass. *Chemical Engineering Research and Design*, 88(5-6), 633-640.
- Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., & Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude

glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, 46(1), 210-218.

Sathitsuksanoh, N., Zhu, Z., & Zhang, Y. H. P. (2012). Cellulose solvent- and organic solvent-based lignocellulose fractionation enabled efficient sugar release from a variety of lignocellulosic feedstocks. *Bioresour Technol*, 117(0), 228-233.

Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*, 83(1), 1-11.

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

Vicente, G., Bautista, L. F., Rodríguez, R., Gutiérrez, F. J., Sádaba, I., Ruiz-Vázquez, R. M., . . . Garre, V. (2009). Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering Journal*, 48(1), 22-27.

Wu, S., Hu, C., Jin, G., Zhao, X., & Zhao, Z. K. (2010). Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour Technol*, 101(15), 6124-6129.

Xue, F., Miao, J., Zhang, X., Luo, H., & Tan, T. (2008). Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as

culture medium. *Bioresour Technol*, 99(13), 5923-5927.

Yadav, K. S., Naseeruddin, S., Prashanthi, G. S., Sateesh, L., & Rao, L. V. (2011).

Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Bioresour Technol*, 102(11), 6473-6478.

Ye, H., Zhu, Y., Xue, F., & Tan, T. (2010). Two-stage fermentation method for lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Biotechnology*, 150, Supplement(0), 149.

Yu, X., Zeng, J., Zheng, Y., & Chen, S. (2014). Effect of lignocellulose degradation products on microbial biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Process Biochemistry*, 49(3), 457-465.

Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, K. M., & Chen, S. (2011). Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresour Technol*, 102(10), 6134-6140.

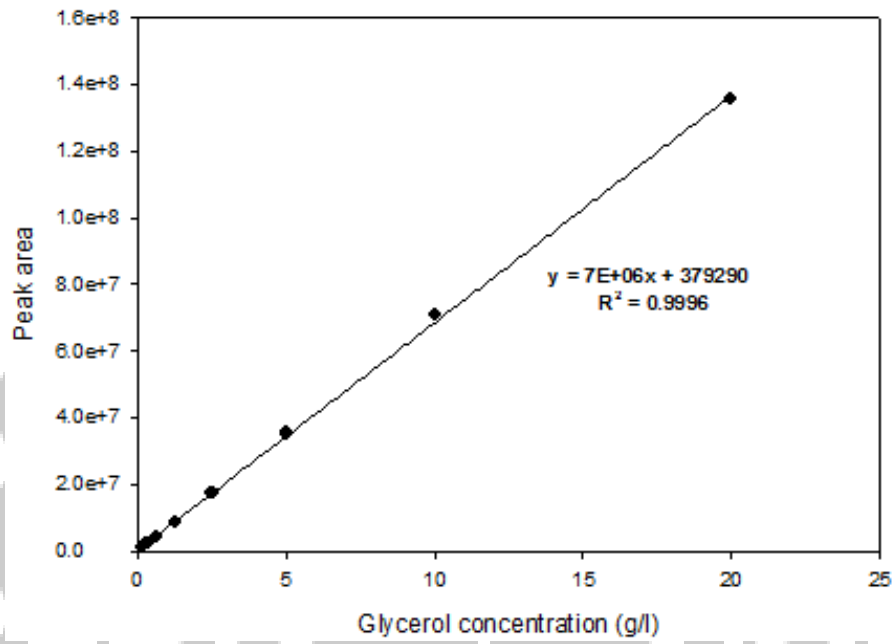
Zhang, G., French, W. T., Hernandez, R., Alley, E., & Paraschivescu, M. (2011).

Effects of furfural and acetic acid on growth and lipid production from glucose and xylose by *Rhodotorula glutinis*. *Biomass and Bioenergy*, 35(1), 734-740.

附錄

附錄 A

甘油標準檢量線

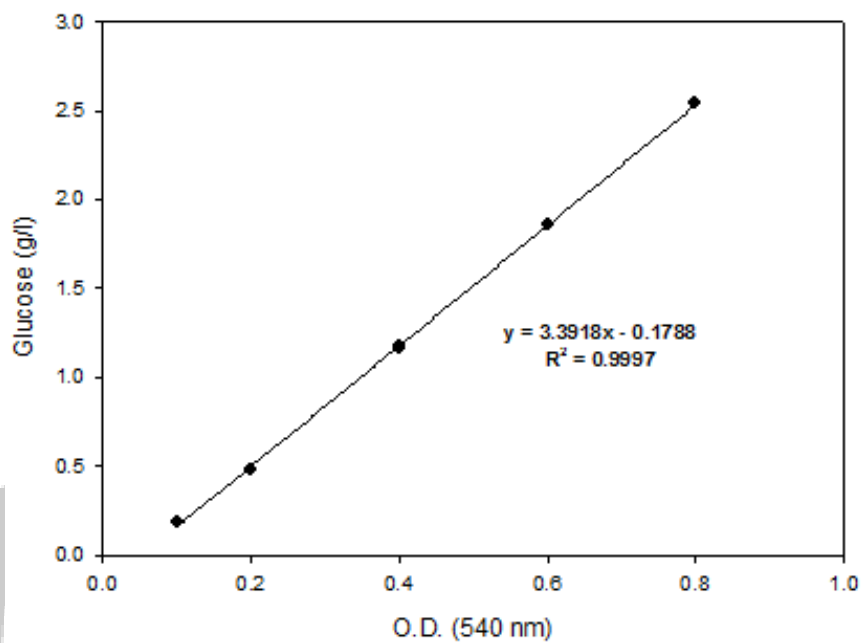


甘油(Glycerol)標準檢量線方程式：

$$\text{Peak area} = 7000000 \times (\text{Glycerol concentration}) + 379290$$

附錄 B

還原糖檢量線

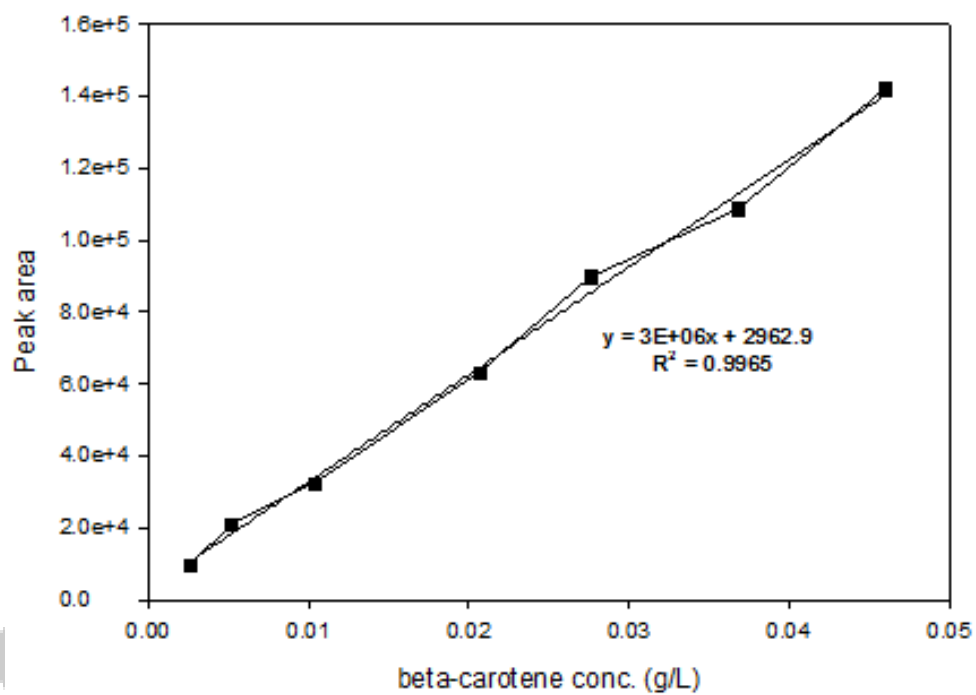


還原糖檢量線方程式：

$$\text{還原糖 (g/l)} = 3.3918 \times \text{O.D.}_{540\text{nm}} - 0.1788$$

附錄 C

β -胡蘿蔔素的標準檢量線

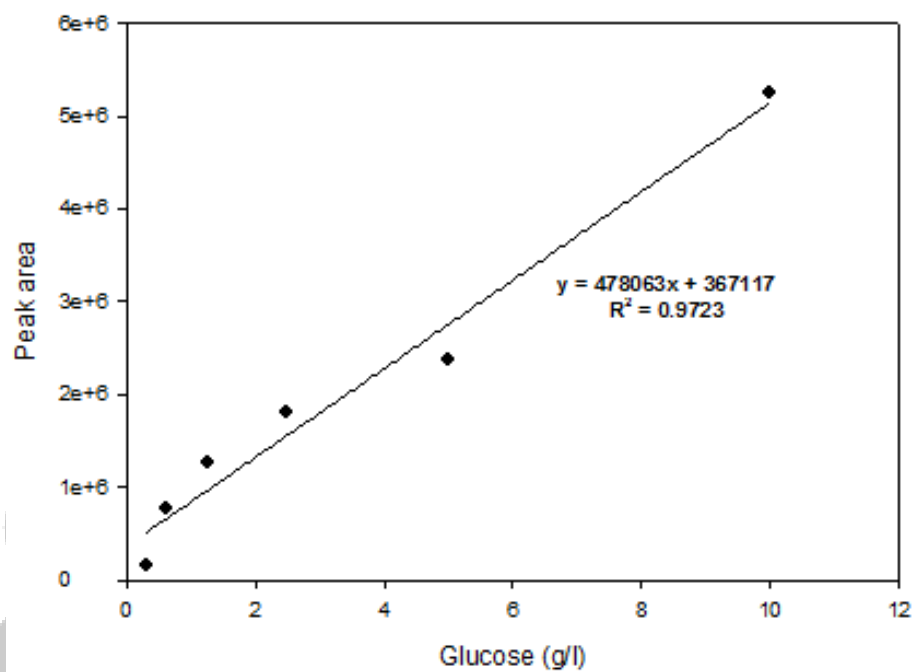


β -胡蘿蔔素檢量線方程式：

$$\text{Peak area} = 3000000 \times (\beta\text{-胡蘿蔔素 Concentration}) + 2969.9$$

附錄 D.1

葡萄糖(Glucose)標準檢量線

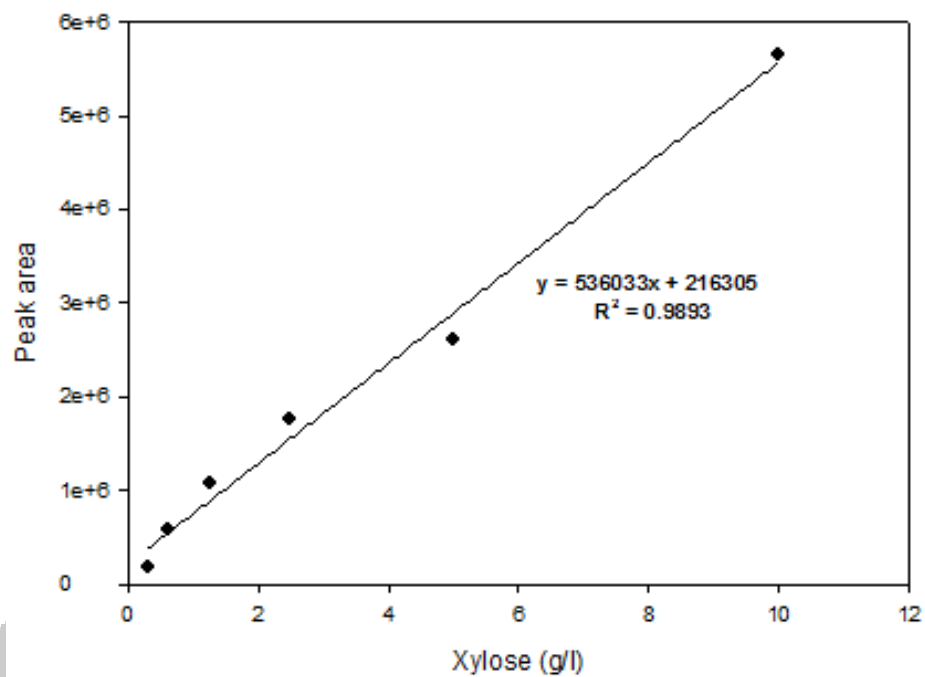


葡萄糖檢量線方程式：

$$\text{Peak area} = 478063 \times (\text{葡萄糖 Concentration}) + 367117$$

附錄 D.2

木糖(Xylose)標準檢量線

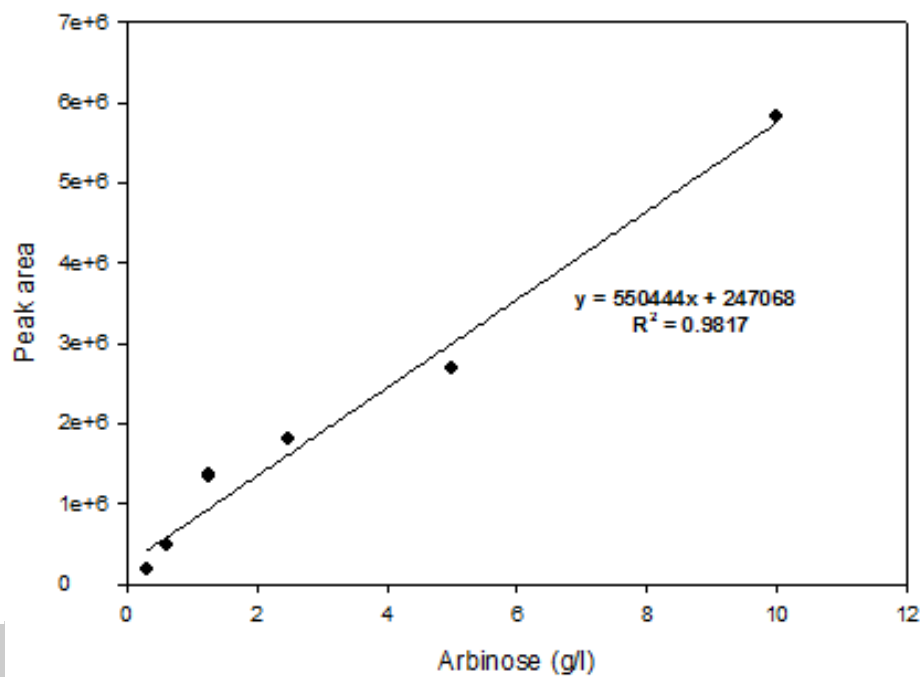


木糖(Xylose)標準檢量線方程式：

$$\text{Peak area} = 536033 \times (\text{木糖 Concentration}) + 216305$$

附錄 D.3

戊醛糖(Arbinose)標準檢量線

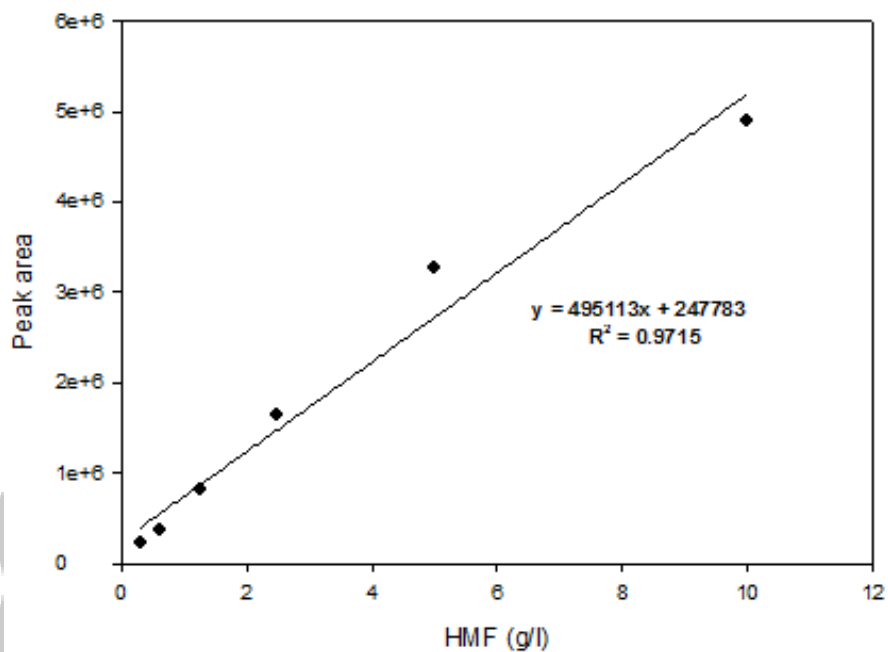


戊醛糖(Arbinose)檢量線方程式：

$$\text{Peak area} = 550444 \times (\text{戊醛糖 Concentration}) + 247068$$

附錄 D.4

羥甲基糠醛(HMF)標準檢量線

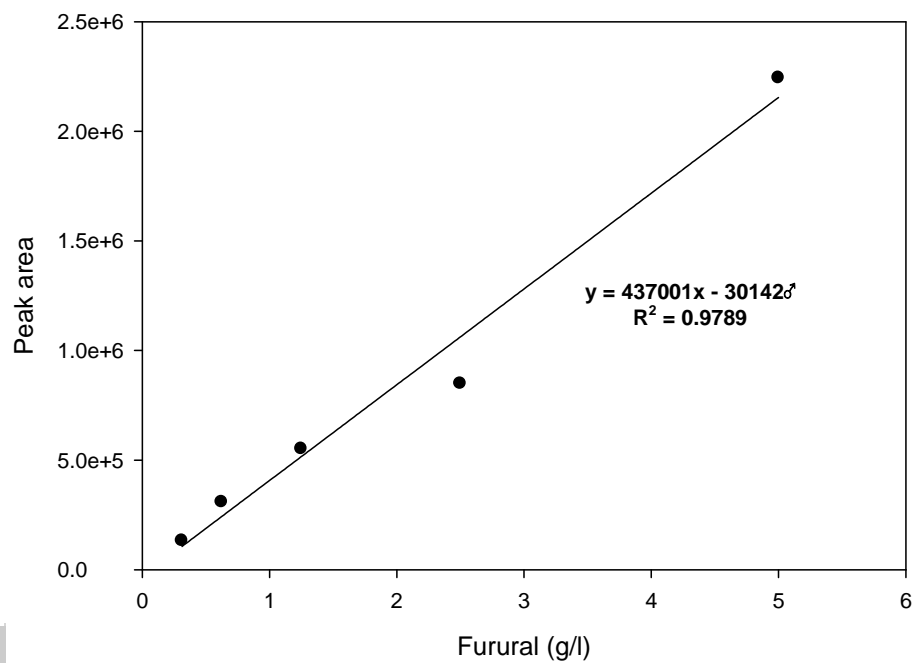


羥甲基糠醛(HMF)檢量線方程式：

$$\text{Peak area} = 495113 \times (\text{HMF concentration}) + 247783$$

附錄 D.5

糠醛(Furural)標準檢量線

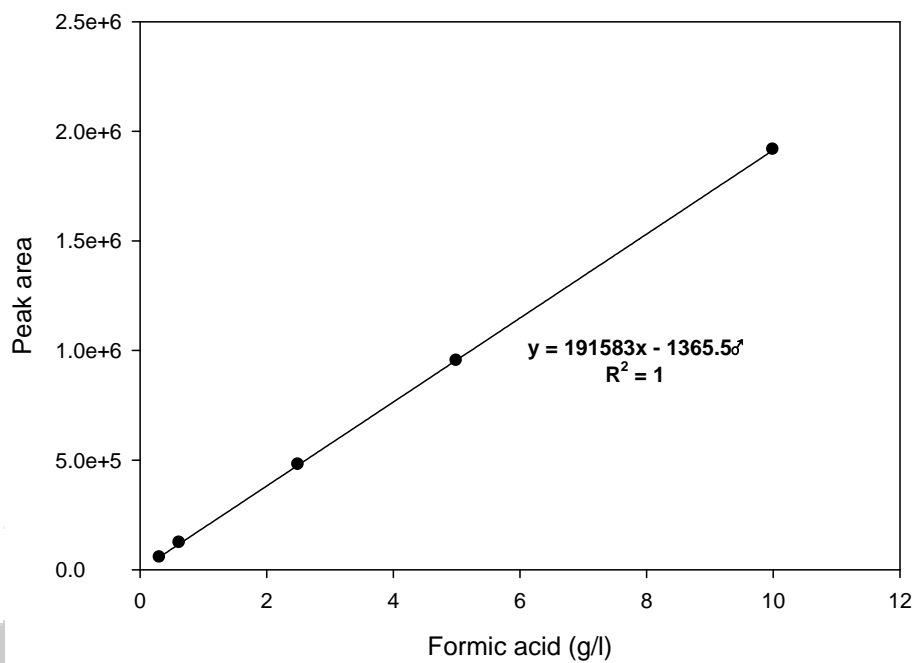


糠醛(Furural)檢量線方程式：

$$\text{Peak area} = 437001 \times (\text{Furfural concentration}) - 30142$$

附錄 D.6

甲酸(Formic acid)標準檢量線

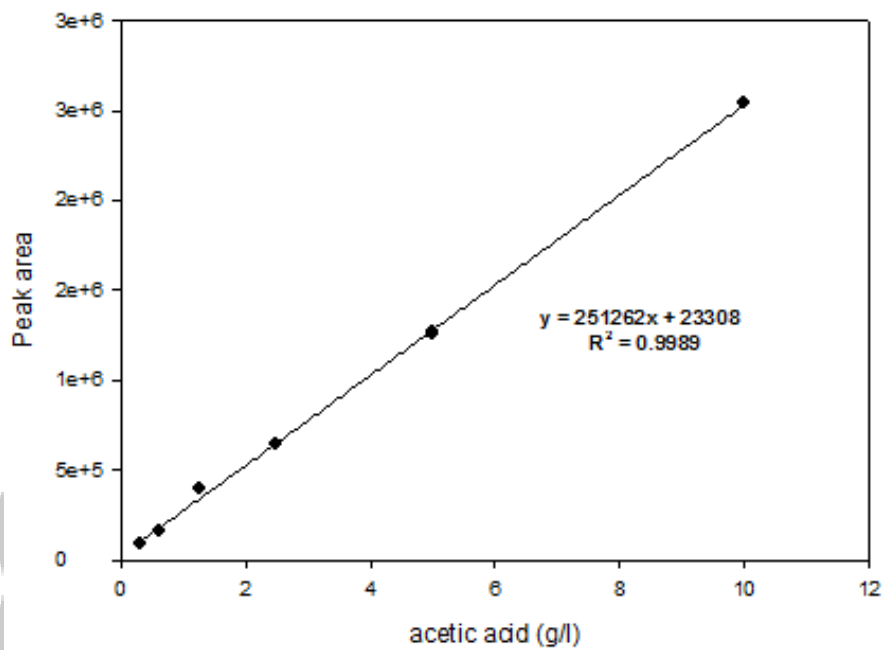


甲酸(Formic acid)檢量線方程式：

$$\text{Peak area} = 191583 \times (\text{Formic acid concentration}) - 1365.5$$

附錄 D.7

乙酸(Acetic acid)標準檢量線



乙酸(Acetic acid)檢量線方程式：

$$\text{Peak area} = 251262 \times (\text{acetic acid concentration}) + 23308$$

附錄 E

水解預處理之數據整理

不同隔水加熱時間對水解預處理還原糖生成之影響

Heated bath Time (min)	1% HCl (% , g/g)		2% HCl (% , g/g)		5% HCl (% , g/g)	
	Rice bran	Algae	Rice bran	Algae	Rice bran	Algae
30	43.1±2.9	12.7±5.9	52.3±2.1	22.5±1.9	50.2±3.4	30.5±6.9
60	37.2±9.8	19.2±5.7	55.9±2.2	25.5±6.3	44.8±3.5	27.4±4.9
90	50.1±11.2	13.6±1.4	56.9±2.0	19.0±1.7	50.4±1.9	24.4±4.8
120	59.1±0.9	28.8±6.7	58.2±1.3	34.1±6.7	50.9±4.4	34.7±8.2

不同酸水解對水解預處理還原糖生成之影響

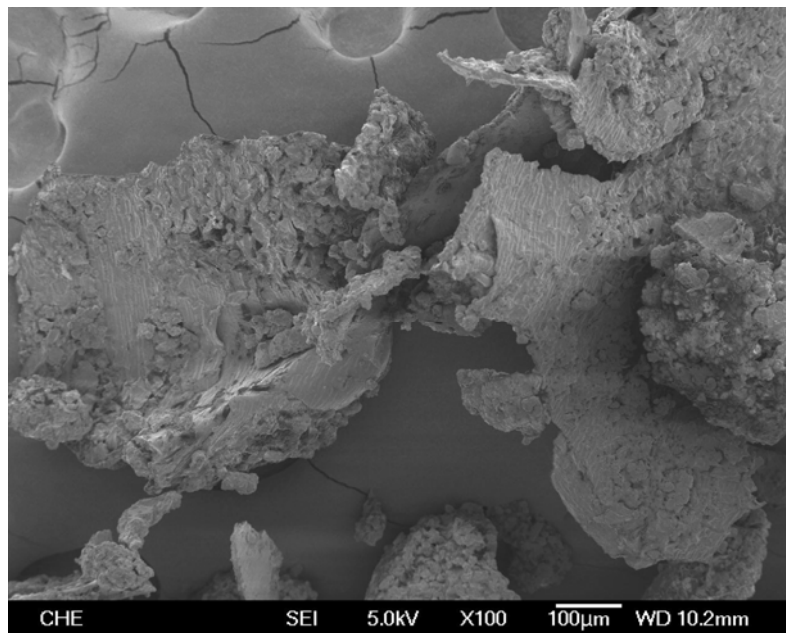
	鹽酸(HCl) (% , g/g)	硝酸(HNO ₃) (% , g/g)	硫酸(H ₂ SO ₄) (% , g/g)	磷酸(H ₃ PO ₄) (% , g/g)
Rice bran	52.3±2.1	48.7±1.9	45.8±2.7	14.8±1.0
Algae	30.4±2.9	30.3±3.3	26.8±1.4	2.8±0.5

不同反應溫度下對水解預處理還原糖生成之影響

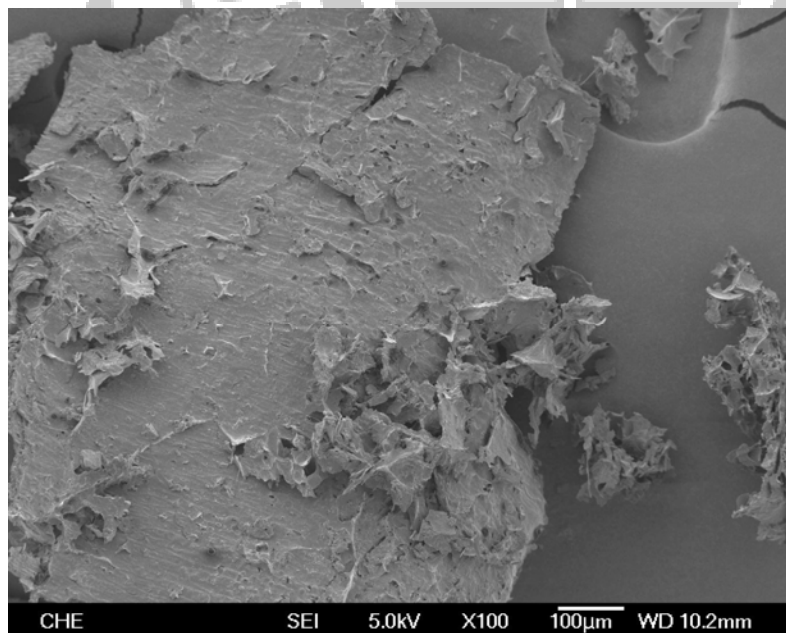
	80 °C (% , g/g)	100 °C (% , g/g)	120 °C (% , g/g)
Rice bran	17.4±0.7	52.3±2.1	47.0±12.5
Algae	24.1±2.3	30.5±3.0	25.1±1.76

附錄 F

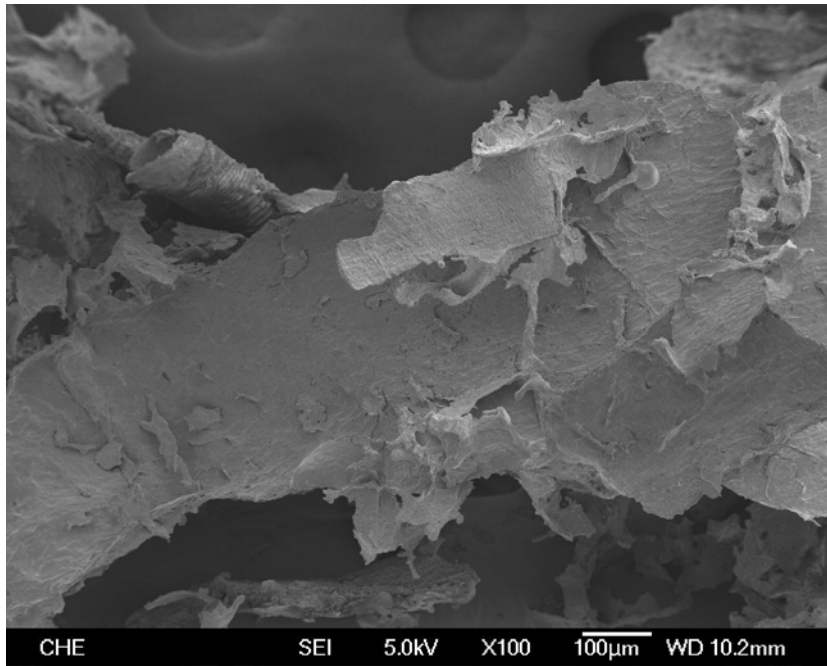
下圖為米糠、米糠稀酸預水解、米糠酵素水解之 SEM 下的圖片



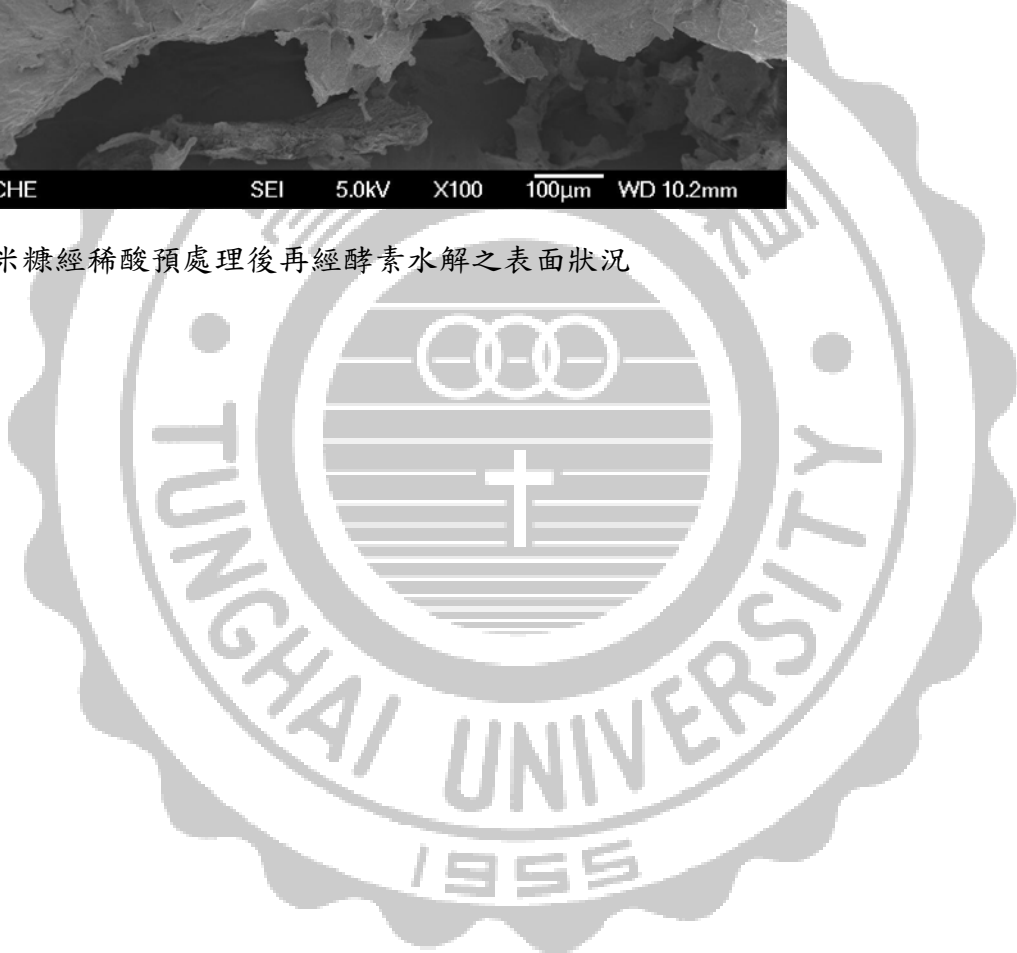
圖米糠基質於 SEM 下之狀況



圖米糠經稀酸預處理後之表面狀況



圖米糠經稀酸預處理後再經酵素水解之表面狀況



附錄 G

下表為利用不同碳源(30 g/l)培養 *R. glutinis* 所得到之 β -胡蘿蔔素

Carbon source	β -carotene (mg/g)
Glucose	2.22±0.02
Crude glycerol	0.96
Xylose	0.54±0.15
Lignocellulosic hydrolysate	2.74±0.03
Rice bran	2.33±0.2

下表為利用纖維水解液(核能所提供)在攪拌式發酵槽和氣舉式發酵槽，培養 *R. glutinis* 所得到之 β -胡蘿蔔素

Fermenter	Aeration (vvm)	β -carotene (mg/g)
Agitation	1	2.2±0.12
Airlift	1	1.02±0.08
Airlift	2	0.43±0.16

下表為不同纖維水解液添加粗甘油作為碳源，培養 *R. glutinis* 所得到之 β -胡蘿蔔素

Carbon source	β -carotene (mg/g)
Lignocellulosic hydrolysate	0.84±0.08
Rice bran hydrolysate	1.76±0.11
Algae hydrolysate	1.00±0.08

CHE203 實驗室之新竹司馬庫斯“看神木一日遊

