

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏宏偉 博士

Advisor : Hong-Wei Yen, Ph.D.

以粗甘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

β -carotene and lipid production by oleaginous yeast

Rhodotorula glutinis in an airlift bioreactor: use of crude
glycerol as a carbon source

研究生：劉懿嫻 撰

Graduate student : Yi-Xian Liu

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

中文摘要

Rhodotorula glutinis (BCRC 22360) 是一株可累積高油脂的酵母菌，其中不飽和脂肪酸所佔的含量高，且類似於植物油，適合作為製造生質柴油的油脂。除了生產油脂外也富含高價值的 β -胡蘿蔔素， β -胡蘿蔔素是天然的抗氧化劑，利用分子中含有多個雙鍵能與具有不成對電子的自由基結合來中斷脂質過氧化連鎖反應，進而保護細胞不被破壞。*R. glutinis* 細胞生長迅速、可達高密度細胞培養，因此具有相當高發展潛力。在綠色能源意識高漲下，使得生質柴油產量大幅提升，同時累積大量的副產物粗甘油，而粗甘油中含有未反應的脂肪酸、醇類及催化劑等，在純化的製程上較為複雜且高成本，因此使用粗甘油作為培養基的碳源可作為解決粗甘油的方法。本研究使用粗甘油做為碳源並利用氣舉式發酵槽作為反應器以及探討不同發酵策略來提升 *Rhodotorula glutinis* 生長、油脂含量及 β -胡蘿蔔素含量，進而提高整體產物之生產速率。

在搖瓶實驗中，分別做培養基組成、環境因子、添加誘導因子的影響，藉此增加 β -胡蘿蔔素的提升，其中在照白光實驗中，以 $38.18 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 光強度進行照射 48 hr，能夠明顯提升 *R. glutinis* 濃度 4.50 g/L 至 6.67 g/L 及 β -胡蘿蔔素含量從 2.22 mg/g 提升至 2.44 mg/g；在培養 0 小時添加 0.5 mM 過氧化氫相較於未添加者，可明顯提升 β -胡蘿蔔素含量從 2.11 mg/g 提升至 2.64 mg/g；在改變培養基介質為海洋深層水的實驗中發現含有有機氮所得到的菌體濃度是不含有機氮組的 2 倍，達到 5.0 g/L，然而在累積油脂上，不含有機氮組能明顯提高 20%，高達 44.11%。

放大實驗中分成三個部分探討，(1) 5 L 氣舉式發酵槽批次的實驗中，改變通氣量的影響，結果得到生物量生產速率與通氣量有正關係，而以 2.5 vvm 通氣量

下可得到最大生物產率高達 0.46 g/L/hr、最大油脂生產速率 0.22 g/L/hr 以及最大 β -胡蘿蔔素產率 1.1 mg/L/hr。(2) 為了提升槽體內溶氧量並能節省空壓機供應氣體所消耗的能源，本實驗使用 5 L 氣舉式發酵槽，並在排氣處設置閥，利用出口閥開合大小改變槽壓的影響，結果顯示出，增加槽體壓力對於菌種濃度及 β -胡蘿蔔素的含量之間沒有直接關係。故對於 *R. glutinis* 的培養，在操作及成本考量上，氣升式生物反應器相對於傳統的攪拌生物反應器是較合適的培養系統。(3) 使用 50 L 氣舉式發酵槽，探討饋料策略的不同對於 *R. glutinis* 生長的影響，分別以一次性饋料、等速度饋料 (0.3 L/hr)、指數型速度饋料；指數型饋料利用方程式 $FS_0 = \frac{\mu X_0 V_0 e^{\mu t}}{Y_{X/S}}$ 來計算該時間點的生物含量所需的碳源濃度，此能有效提升生物濃度，而以微生物油脂生產速率與 β -胡蘿蔔素生產速率的影響上，以一次性饋料的策略則能得到最佳結果，分別為 0.45 g/L/hr、0.82 mg/L/hr。

關鍵字：*R. glutinis*、 β -胡蘿蔔素、通氣量、發酵策略

Abstract

Rhodotorula glutinis (BCRC 22360) is an oleaginous yeast that can accumulate high content of total lipid, which is suitable as a microbial oil producer for the production of oil feedstock converted to biodiesel. In addition to total lipids production, *R. glutinis* was well known to have high content of β -carotene, which is a natural antioxidants to protect cells from being damaged by free radical through the interruption of lipid peroxidation chain reaction. Even though, the production cost was still a problem inhibiting the commercialized biodiesel production by using the microbial oils as the feedstock. In this study, the effects of fermentation strategy on cell growth and β -carotene production in airlift bioreactor by using crude glycerol as carbon source were investigated.

The effects of medium ingredients and environmental cultivation conditions on the β -carotene content and total lipid production were evaluated. It was found that the irradiation for 48 hours can significantly enhance the biomass from 4.50 g/L to 6.67 g/L and β -carotene content from 2.22 mg/g to 2.44 mg/g. By adding 0.5 mM of peroxide can significantly enhance the β -carotene content from 2.11 mg/g to 2.64 mg/g. The experiments by using deep ocean mineral water with organic nitrogen could have two times of biomass higher than the medium with inorganic nitrogen. However, for the lipid content, the medium with inorganic nitrogen could significantly increase by 20%, up to the value of 44.11%.

Three parts were discussed in the trial of scale up experiment, including (1) Aeration rate of 1 vvm, 1.5 vvm, 2 vvm and 2.5 vvm were performed respectively in a

5 L airlift bioreactor. It seems that the increase of aeration rate can increase the cells growth rate. The batch with 2.5 vvm could achieve the maximum cells productivity of 0.46 g/L/hr, the maximum lipid production rate of 0.22 g/L/hr and the maximum β -carotene production rate of 1.1 mg/L/hr. (2) By controlling the outlet valve to increase the pressure of 5 L airlift bioreactor, which could potentially avoid the high pump power consumption and enhance the dissolved oxygen. The results show that there is no significant effect on the improvement of cells growth and β -carotene content. Conclusively, this study indicated that airlift bioreactor can be a suitable system for the cultivation of oleaginous *R. glutinis* due to its relatively simple operation cost as compared to the conventional agitation bioreactor. (3) To enhance the β -carotene productivity, high cell concentration and high cell productivity that controlling the specific growth rate of cells would be the critical points. In this study, varied feeding criteria including pulse feeding, the feeding with constant rate (0.3 L/hr) and the exponential feeding were tested in the 50 L airlift bioreactor. The fed-batch operation with the exponential feeding could effectively enhance the biomass productivity. Nevertheless, one-time feeding could have the positive effects on lipid production and β -carotene production which was 0.45 g/L/hr and 0.82 mg/L/hr respectively.

Keywords: *Rhodotorula glutinis* 、 β -carotene 、 biodiesel 、 lipid 、 fermenter strategy

謝誌

首先誠摯的感謝指導教授 顏宏偉老師，在這兩年來的敦敦教誨與教導，指點我研究實驗的正確方向，啟發我獨立思考與解決問題的能力，並適時地予以鼓勵，使我在求學生涯中受益匪淺，在此謹致上由衷的謝意。感謝 楊芳鏘教授，在實驗上給我許多建議與指點，促使我的研究更加順利與完整。感謝成大化工所 張嘉修教授、元智生科所 魏毓宏教授、中興化工所 劉永銓教授，於口試期間所給予的指導與寶貴的建議，才能使得本論文更臻充實，在此致上最誠摯的謝意。

在研究所的求學過程中，感謝學長 證雄、欣培、偉誠、志恆、金杉、義成、阿凱；學姐 依嬛、儷娟、西瓜在研究上的指導與照顧，另外感謝同學 旻玉、小孟、容慈、小喵、黃聖文、施奕全的相互扶持與勉勵，以及學弟 喇叭、蘇國、昭翰、子翔、志淵、惟翔、長逸、奕璋、俊星；學妹 于婷、品姝、秋遐在實驗上面的協助與幫忙，實驗室裡有你們好歡樂，這些點點滴滴的回憶銘記在心。另外感謝在我研究所兩年生涯曾經給予我協助的老師以及同學，感謝有你們讓我的生活多采多姿。最後，謹將此論文獻給我的父母親及家人，感謝他們無盡的付出，以及在精神上的支持與鼓勵，才可以讓我在求學階段無後顧之憂的進行研究，謝謝你們！

目錄

中文摘要.....	II
Abstract.....	IV
謝誌.....	VI
第一章 緒論.....	19
第二章 文獻回顧.....	21
2.1 生質柴油簡介.....	21
2.1.1 生質柴油之副產物-粗甘油 (Crude glycerol)	23
2.1.2 產油微生物	26
2.2 類胡蘿蔔素簡介.....	28
2.2.1 β -胡蘿蔔素(β -carotene)介紹	30
2.2.2 β -胡蘿蔔素的生理活性.....	31
2.2.3 影響 β -胡蘿蔔素產量因子.....	33
2.2.4 β -胡蘿蔔素的生產.....	37
2.3 粘紅酵母菌(<i>Rhodotorula</i>)簡介.....	40
2.3.1 菌種選擇-粘紅酵母菌(<i>Rhodotorula glutinis</i>).....	41
2.4 微生物產油脂與產 β -胡蘿蔔素機制	42
2.5 發酵策略.....	48
2.5.1 批次發酵策略.....	48
2.5.2 饋料發酵策略.....	48
2.5.3 指數型饋料發酵策略.....	48
第三章 材料與方法.....	50

3.1	實驗材料.....	50
3.1.1	菌株.....	50
3.1.2	實驗藥品.....	51
3.2	實驗儀器.....	53
3.3	分析方法.....	55
3.3.1	光照強度測定方法.....	55
3.3.2	菌體濃度分析方法.....	55
3.3.3	葡萄糖濃度分析方法.....	55
3.3.4	總脂質濃度分析方法.....	55
3.3.5	β -carotene 分析方法.....	56
3.3.6	甘油分析方法.....	56
3.4	實驗方法.....	57
3.4.1	原始菌種保存.....	57
3.4.2	培養基組成.....	57
3.4.3	搖瓶發酵培養基 (Fermentation medium, FM).....	58
3.4.4	發酵槽發酵培養基 (Fermentation medium, FM).....	60
3.4.5	接菌.....	60
3.5	實驗架構.....	61
3.6	實驗培養條件.....	62
3.6.1	搖瓶批次發酵程序 (Flask Experiments).....	62
3.6.2	5 L 氣舉式批次發酵程序 (Fermentation Experiments).....	64
3.6.3	20 L 氣舉式批次發酵程序 (Fermentation Experiments).....	65

3.6.4	15 L 攪拌式批次發酵程序 (Fermentation Experiments).....	66
3.6.5	50 L 氣舉式批次饋料發酵程序 (Fermentation Experiments).....	66
3.7	實驗裝置圖.....	69
3.7.1	搖瓶發酵培養裝置圖.....	69
3.7.2	5 L 氣舉式與 20 L 氣舉式批次發酵培養裝置圖.....	69
3.7.3	15 L 攪拌式批次發酵培養裝置圖.....	70
3.7.4	50 L 氣舉式饋料發酵培養裝置圖.....	71
第四章	結果與討論.....	72
4.1	搖瓶批次發酵程序.....	72
4.1.1	不同培養基介質之影響.....	72
4.1.2	鹽度之影響.....	74
4.1.3	培養基 C/N 比之影響.....	76
4.1.4	照光之影響.....	79
4.1.5	添加過氧化氫(H ₂ O ₂)之影響.....	81
4.1.6	添加乙醇之影響.....	86
4.1.7	改變環境因素之綜合探討.....	88
4.2	5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序.....	90
4.2.1	通氣量之影響.....	90
4.2.2	壓力之影響.....	95
4.3	20 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序.....	98
4.3.1	通氣量之影響.....	98
4.4	15 L 攪拌式發酵槽 批次發酵程序.....	101

4.5 50 L 氣舉式發酵槽 饋料發酵程序	104
4.5.1 饋料方式之影響	104
4.6 5 L、20 L、50 L 氣舉式生物反應器與 15 L 攪拌式生物反應器之綜合探討	111
4.7 體積溶氧係數 k_{La}	120
第五章 結論與未來展望	123
5.1 結論	123
5.2 未來展望	125
參考文獻	126
附錄	132
作者簡歷	136

圖目錄

圖 2-1 2005 年至 2010 年世界生物柴油 (長條圖) 和粗甘油 (線) (U.S. Energy Information Administration).....	24
圖 2-2 β -胡蘿蔔素結構.....	30
圖 2-3 β -胡蘿蔔素的結構.....	39
圖 2-4 A scheme to show how the citrate/malate cycle and the cytosolic 'transhydrogenase' cycle	43
圖 2-5 A diagram to show the organisation of a hypothesised lipogenic metabolon.	44
圖 2-6 Reconstruction of central and lipid metabolism pathways of <i>R. glutinis</i>	46
圖 2-7 The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis pathway for the generation of geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP).	47
圖 3-1 <i>Rhodotorula glutinis</i> 在 agar plate 上之外觀	50
圖 3-2 <i>Rhodotorula glutinis</i> 之搖瓶實驗裝置圖	69
圖 3-3 5 L 氣舉式發酵槽裝置圖	69
圖 3-4 20 L 氣舉式發槽裝置圖	70
圖 3-5 15 L 攪拌式發酵槽裝置圖	70
圖 3-6 50 L 氣舉式發酵槽裝置圖	71
圖 4-1 改變培養基介質(逆滲透蒸餾水含 Yeast extract、海洋深層水含 Yeast	

extract、海洋深層水不含 Yeast extract)培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	73
圖 4-2 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.....	74
圖 4-3 固定氮源濃度、改變碳源濃度，培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響 (氮源- (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g/L；碳源- 葡萄糖 30 g/l、60 g/l、120 g/l)	77
圖 4-4 固定碳源濃度、改變氮源濃度，培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響 (碳源-葡萄糖 60 g/L；氮源- (NH ₄) ₂ SO ₄ 4 g/l、2 g/l、1 g/l)	78
圖 4-5 不照光與照光，培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響 (光強度：38.18 μmol/m ² /s).....	80
圖 4-6 探討於培養時間 0 小時時添加 0.5 mM 的過氧化氫對於 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	83
圖 4-7 探討添加不同濃度的過氧化氫對於 <i>R. glutinis</i> 生長之影響 (菌體培養至 48 小時時添加 H ₂ O ₂ ，第 60 小時取樣).....	84
圖 4-8 探討添加不同濃度的過氧化氫對於 <i>R. glutinis</i> 生長之影響 (菌體培養至 48 小時時添加 H ₂ O ₂ ，第 72 小時取樣).....	85
圖 4-9 改變添加乙醇濃度，培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響	86
圖 4-10 改變通氣量(1 vvm、1.5 vvm、2 vvm、2.5 vvm)探討對 <i>R. glutinis</i> 濃度之影響.....	91
圖 4-11 改變通氣量(1 vvm、1.5 vvm、2 vvm、2.5 vvm)探討對 <i>R. glutinis</i> 累積油脂之影響.....	92

圖 4-12 改變通氣量(1 vvm、1.5 vvm、2 vvm、2.5 vvm)探討對 <i>R. glutinis</i> 生產 β -胡蘿蔔素之影響.....	92
圖 4-13 改變通氣量(1 vvm、1.5 vvm、2 vvm、2.5 vvm)探討對 <i>R. glutinis</i> 累積油脂含量及 β -胡蘿蔔素含量之影響.....	93
圖 4-14 5 L 氣舉式發酵槽， <i>R. glutinis</i> 在通氣量 1.5 vvm 下 240 hr 之變化情形.....	94
圖 4-15 5 L 氣舉式發酵槽， <i>R. glutinis</i> 在通氣量 2 vvm 下 120 hr 之變化情形.....	94
圖 4-16 固定通氣量 1.5 vvm，改變壓力(0 atm、0.2 atm、0.5 atm)探討對 <i>R. glutinis</i> 濃度之影響.....	96
圖 4-17 固定通氣量 1.5 vvm，改變壓力(0 atm、0.2 atm、0.5 atm)探討對 <i>R. glutinis</i> 累積油脂之影響.....	96
圖 4-18 固定通氣量 1.5 vvm，改變壓力(0 atm、0.2 atm、0.5 atm)探討對 <i>R. glutinis</i> 累積油脂含量及 β -胡蘿蔔素含量之影響.....	97
圖 4-19 改變通氣量(0.75 vvm、1.25 vvm、1.5 vvm)探討對 <i>R. glutinis</i> 濃度之影響.....	98
圖 4-20 改變通氣量(0.75 vvm、1.25 vvm、1.5 vvm)探討對 <i>R. glutinis</i> 油脂累積之影響.....	99
圖 4-21 改變通氣量(0.75 vvm、1.25 vvm、1.5 vvm)探討對 <i>R. glutinis</i> 濃度產 β -胡蘿蔔素之影響.....	99
圖 4-22 改變通氣量(0.75 vvm、1.25 vvm、1.5 vvm)探討對 <i>R. glutinis</i> 累積油脂含量及 β -胡蘿蔔素含量之影響.....	100

圖 4-23 改變生物反應器(15 L 攪拌式發酵槽、5 L 氣舉式發酵槽)探討對 <i>R. glutinis</i> 濃度之影響.....	101
圖 4-24 改變生物反應器(15 L 攪拌式發酵槽、5 L 氣舉式發酵槽)探探討對 <i>R. glutinis</i> 油脂累積之影響.....	102
圖 4-25 改變生物反應器(15 L 攪拌式發酵槽、5 L 氣舉式發酵槽)探討對 <i>R. glutinis</i> 累積油脂含量及 β -胡蘿蔔素含量之影響	102
圖 4-26 改變饋料方式探討對 <i>R. glutinis</i> 生長濃度之影響(一次性饋料、等速饋料、指數型饋料；饋料粗甘油濃度 686 g/L；第 48 小時進行饋料).....	106
圖 4-27 改變饋料方式探討對 <i>R. glutinis</i> 油脂累積之影響 (一次性饋料、等速饋料、指數型饋料；饋料粗甘油濃度 686 g/L；第 48 小時進行饋料).....	106
圖 4-28 改變饋料方式探討對 <i>R. glutinis</i> 生產 β -胡蘿蔔素之影響 (一次性饋料、等速饋料、指數型饋料；饋料粗甘油濃度 686 g/L；第 48 小時進行饋料).....	107
圖 4-29 改變饋料方式探討對 <i>R. glutinis</i> 積油脂含量及 β -胡蘿蔔素含量之影響 (一次性饋料、等速饋料、指數型饋料；饋料粗甘油濃度 686 g/L)	107
圖 4-30 改變饋料方式探討對 <i>R. glutinis</i> 生長濃度之影響(一次性饋料、指數型饋料；饋料粗甘油總濃度 1371 g/L；第 48、96 小時進行饋料).....	108
圖 4-31 改變饋料方式探討對 <i>R. glutinis</i> 油脂累積之影響 (一次性饋料、指數型饋料；饋料粗甘油濃度 1371 g/L；第 48、96 小時進行饋料).....	108
圖 4-32 改變饋料方式探討對 <i>R. glutinis</i> 生產 β -胡蘿蔔素之影響 (一次性饋料、指數型饋料；饋料粗甘油濃度 1371 g/L；第 48、96 小時進行饋料).....	109
圖 4-33 利用動態溶氧方法來測時不同發酵槽(5 L 氣舉式發酵槽、15 L 氣舉式	

發酵槽、50 L 氣舉式發酵槽)並探討對 *R. glutinis* 生長之影響 121

表目錄

表 2-3 粗甘油微量元素分析表(Thompson and He 2006)	25
表 2-4 微生物細胞油脂中的應用 (Huang, Chen et al. 2013).....	27
表 2-5 各種類胡蘿蔔素的功能 (孫證雄, 2011).....	29
表 2-6 常見類胡蘿蔔素的微生物來源(El-Banna 2012)	29
表 3-1 實驗藥品清單	51
表 3-2 實驗儀器清單	53
表 3-3 種子培養基	57
表 3-4 發酵培養基	58
表 3-5 C/N 比培養基.....	59
表 3-6 發酵培養基	60
表 3-7 饋料培養基與方式	68
表 4-1 改變培養基介質(逆滲透蒸餾水含 Yeast extract、海洋深層水含 Yeast extract、海洋深層水不含 Yeast extract) 培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響 之實驗數據.....	73
表 4-2 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 之實驗數據.....	75
表 4-3 固定氮源濃度、改變碳源濃度，培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影 響之實驗數據 (氮源- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L；碳源- 葡萄糖 30 g/l、60 g/l、120 g/l) 77	77

表 4-4 固定碳源濃度、改變氮源濃度，培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響之實驗數據 (碳源-葡萄糖 60 g/L；氮源- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g/l、2 g/l、1 g/l)	78
表 4-5 不照光與照光，培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響之實驗數據 (光強度：38.18 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).....	80
表 4-6 探討於培養時間 0 小時時添加 0.5 mM 的過氧化氫對於 <i>R. glutinis</i> 生長之影響.....	83
表 4-7 探討添加不同濃度的過氧化氫對於 <i>R. glutinis</i> 生長之影響 (菌體培養至 48 小時時添加 H_2O_2 ，第 60 小時取樣).....	84
表 4-8 探討添加不同濃度的過氧化氫對於 <i>R. glutinis</i> 生長之影響 (菌體培養至 48 小時時添加 H_2O_2 ，第 72 小時取樣).....	85
表 4-9 改變添加乙醇濃度，培養 48 hr，並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長影響之實驗數據.....	87
表 4-10 海洋深層水、鹽度、C/N 比、照光、添加過氧化氫、添加乙醇之 <i>R. glutinis</i> 濃度、油脂與 β -胡蘿蔔素	89
表 4-11 改變通氣量(1 vvm、1.5 vvm、2 vvm、2.5 vvm)批次發酵策略之動力參數.....	93
表 4-12 固定通氣量 1.5 vvm，改變槽體壓力(0 atm、0.2 atm、0.5 atm)批次發酵策略之動力參數.....	97
表 4-13 改變通氣量(0.75 vvm、1.25 vvm、1.5 vvm)批次發酵策略之動力參數.....	100
表 4-14 改變生物反應器(15 L 攪拌式發酵槽、5 L 氣舉式發酵槽)批次發酵策略	

之動力參數.....	103
表 4-15 改變饋料方式(一次性饋料、等速饋料、指數型饋料)及饋料濃度(686、1371 g/L)饋料批次發酵策略之動力參數.....	110
表 4-16 對於累積油脂比較，各發酵槽實驗之動力學參數整理	112
表 4-17 對於 β -胡蘿蔔素比較，各發酵槽實驗之動力學參數整理.....	114
表 4-18 累積油脂部分，發酵槽實驗與文獻之比較	116
表 4-19 β -胡蘿蔔素部分，發酵槽實驗與文獻之比較.....	118
表 4-20 利用動態溶氧方法來測時不同發酵槽(5 L 氣舉式發酵槽、15 L 氣舉式發酵槽、50 L 氣舉式發酵槽)並探討對 <i>R. glutinis</i> 生長之影響	122

第一章 緒論

近年來由於全球產業提升，工業大量開發，導致了石化能源日益耗竭，二氧化碳大量排放，不僅在經濟上受到原油價格波動的影響，以及造成海平面上升、全球暖化等環境破壞，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。

在眾多替代能源中，生質能源方面包含了生質酒精以及生質柴油，根據 F.O.Licht 統計 2009 年至 2010 年全球生質燃料成長將近 10%。其中，生質柴油產量約占 19.4% (World Ethanol & Biofuels Report)。生質柴油是利用動植物油或食物廢油經由常見的轉酯化製程方式所得到的生質能源。生質柴油不僅擁有生物可降解性、無毒性的和清潔的可再生等特性，以及其特性與常規柴油燃料相似，使得其在油價高漲的時期具有一定的競爭力。

在製備生質柴油上多半以植物油作為料源，如：向日葵(Sunflower)、油菜(Rape)、大豆(Soybean)和棕櫚油(Palm oils)等，相對地造成了與民爭食及土地受限等問題，進而延伸利用農業廢棄物做為料源，但又因運輸上的成本花費以及所產生的空氣汙染並不利於生產，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關注的議題。

每生產 3 mol 生質柴油，便會產生的 1 mol 的副產物-粗甘油，而其中含有 40%至 70%甘油，0%至 10%的鹽，8%至 50%水，低於 0.5%甲醇與 0.5%脂肪酸 (Stelmachowski 2011)。若以粗甘油經由精煉成純甘油後使用在工業、藥品、食品、化妝品、飲料...等，所花費的生產成本過高。顯然地，另闢使用粗甘油的新路線被視為很重要的環節。利用粗甘油作為碳源，進行微生物發酵產出的油脂以及高單價的副產物，不僅能解決高成本的問題也能改善環境的污染。

為了有效利用粗甘油，使用富含油脂的酵母菌進行培養，除了能產出微生物油脂作為生質柴油的料源外，也產出高價的β-胡蘿蔔素。再者，β-胡蘿蔔素具有幾點重要的特色，包括了扮演維生素 A 的前體、抗氧化劑、免疫調節等功能，且在食品染色、保健食品、飼料、化妝品上皆有廣泛的應用，故本實驗利用粗甘油作為培養基碳源，且以粘紅酵母菌(*Rhodotorula glutinis*)進行發酵研究，進而藉由氣舉式發酵槽來探討不同進氣量下對於菌體生長及代謝產物的影響，以及改變饋料方式對產率的影響性。

第二章 文獻回顧

2.1 生質柴油簡介

在 1890 年代，柴油發電機由 Rudolph Diesel 所開發的，在當時柴油發電機被視為高機動性且經濟性，初期，為了測試發電機使用多種燃油的可用性，且對於石化燃料較少的偏遠地區在使用農業供電的柴油發電機上有更方便的選擇，研究上使用植物油作為油料，此時便成為了植物油燃料的第一階段研究；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 1972 年世界石油危機，不僅石油價格提升，且工業化所造成的全球暖化帶來的環境衝擊，使得生質柴油等替代能源的研究逐漸受到重視 (Pacific Biodiesel)。

生質柴油目前主要裡用植物、動物脂肪或食用油經由轉酯化反應所製成的，其特性具有生物可降解性、無毒性、及燃燒過後所產生的氣體污染性低，可被添加於石化柴油中混合使用，然而，使用植物油為料源會造成與民爭食及土地限制等問題，為了排除上述困難，發展了第三代生物柴油燃料；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 (Yoon and Rhee 1983); (Li, Zhao 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, French et al. 2009)。微生物油脂累積量與組成如表 2-1、表 2-2。

表 2-1 Oil content of some microorganisms (Meng, 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

表 2-2 Lipid composition of some microorganisms (Meng, 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	-

2.1.1 生質柴油之副產物-粗甘油 (Crude glycerol)

在綠色能源的提倡下，生物柴油的生產逐年提升，如圖 2-1(U.S. Energy Information Administration)，進而產生大量的副產品，如筋麵粉，麵筋，紙漿，廢水和粗甘油(Schievano, D'Imporzano et al. 2009)，其中粗甘油佔總殘餘物的 10%，造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環境問題(Oh, Seo 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 Cü elik, Nalan Ozbay et al. 2008)。

為了能更有效利用粗甘油，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。此外，有研究發現，甘油的代謝對消化能的比例類似於玉米或大豆油(Lammers, Kerr et al. 2008)，並且粗甘油的營養成分相似於玉米殼，可以取代家畜飲食中的可發酵澱粉的 10%，而目前的售價為市場上一半的價格，如此一來成了一個具有吸引力的選擇(Morrison 2007)。然而，粗甘油中含有大量甲醇，被認為是有害的，但有研究表明甲醇是不會傷害到反芻動物，反而可以是一個很好的廉價的補充牲畜飼料。除此之外，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 Cü elik, Nalan Ozbay et al. 2008)，表 2-3 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。

將粗甘油運用在微生物發酵工程上，不僅減少純化的程序，也降低了環境上

的破壞，更能有效廢物利用，在生質柴油的生產上更加有利可圖，目前粗甘油也作為碳源用於生產高價值的化合物，如 1,3-丙二醇(Hiremath, Kannabiran et al. 2011)，乙醇(Wu, Lin et al. 2011)，琥珀酸(Lee, Lee et al. 2001)和海藻糖(Ruhal, Aggarwal et al. 2011)。

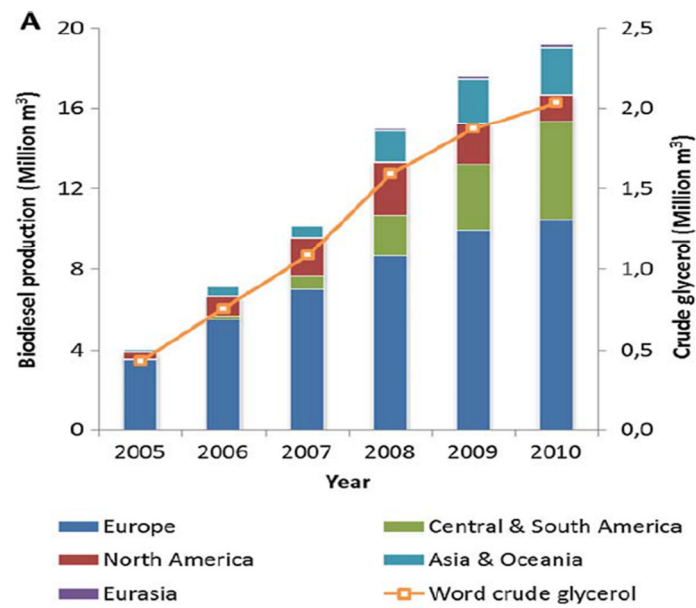


圖 2-1 2005 年至 2010 年世界生物柴油(長條圖)和粗甘油(線)(U.S. Energy Information Administration)

表 2-3 粗甘油微量元素分析表(Thompson and He 2006)

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

*BDL：表示低於檢測分析方法的相應極限值。

2.1.2 產油微生物

微生物油脂，又稱單細胞油（Single Cell Oils, SCO），因其組成相似於植物油，且能積累脂質達到其生物量的20%以上(Ratledge 1991)，所以被認為是可用於生產生物柴油的料源，許多含油微生物，如細菌，酵母，真菌和微藻類皆具有這樣的特性；表2-4 是微生物細胞油脂的應用(Huang, Chen et al. 2013)。

製造生質柴油上，原料的選擇是成本考量的重要關鍵，為了避免使用植物油導致民爭食的問題，目前有許多研究是利用微生物油脂作為生物柴油的生產原料 (Minkevich, Dedyukhina et al. 2010)；(Papanikolaou and Aggelis 2011)，然而，發酵製程上所消耗的高成本，限制了進一步的應用和產業化，因此，有文獻表明含油微生物具有可利用廢物有機物而產生脂質的能力，此不僅能降低成本、環境的破壞，也不受於土地的限制，部分廢物材料已經被研究作為微生物發酵的原料 (Chi, Zheng et al. 2011)；(Chinnasamy, Bhatnagar et al. 2010)，如玉米芯廢液 (Venkata Subhash and Venkata Mohan 2011)、木質纖維素 (Huang et al., 2012)、水解稻稈等作為培養基。

表 2-4 微生物細胞油脂中的應用 (Huang, Chen et al. 2013)

功能及應用	菌種
生產生物柴油的替代原料	<i>Rhodotorula glutinis</i>
	<i>Trichosporon fermentans</i>
	<i>Cladophora fracta</i>
	<i>E. coli</i>
可可脂的替代品	<i>Yarrowia lipolytica</i>
	<i>Apiotrichum curvatum</i>
花生四烯酸 (ARA)	<i>Sirodotia Kylin</i>
	<i>Mortierella alpine</i>
二十二碳六烯酸 (DHA)	<i>Schizochytrium</i> sp S31
	<i>Schizochytrium</i> G13/2S
二十碳五烯酸 (EPA)	<i>Candida guilliermondii</i>

2.2 類胡蘿蔔素簡介

類胡蘿蔔素是具有黃色、橙色及紅色的天然脂溶性色素，且被歸類為萜類化合物，主要分佈在水果、蔬菜和微生物中。19 世紀初至今已發現七百多種類胡蘿蔔素，各種胡蘿蔔素皆有不同生理功能，大致上皆有抗氧化活性，被作為抗氧化劑以減少細胞或組織的損傷，在食品方面可作為著色添加劑，如人造奶油、黃油、奶酪、烘焙食品劑(Bauernfeind 1981)；在醫療方面能作為抗癌劑，如單線態氧或自由基的清除劑(Hennekens 1997)。

類胡蘿蔔素是由八個異戊二烯(Isoprene, 2-Methyl-buta-1,3-diene)所構成，主鏈上為多聚烯，是以碳—碳雙鍵與單鍵相互作用，所形成的共軛體系，使得電子可在分子內自由活動，而末端基團形成環狀，且有氧原子的附加；隨著雙鍵的增加對於自由基反應的結合能力也有所提升，故在結構上與其抗氧化的活性具有相當的關聯(Marova, Carnecka et al. 2012)。

類胡蘿蔔素可分成兩種，一種為僅含碳氫的化合物，稱為胡蘿蔔素(carotene)，如 α -胡蘿蔔素 (α -carotene)、 β -胡蘿蔔素(β -carotene)及蕃茄紅素 (lycoxanthin) 等，另外一種為含氧的衍生物，稱為葉黃素(xanthophyll)，如葉黃素(lutein)、蝦紅素 (astaxanthin) 和玉米黃素 (zeaxanthin)；各種類胡蘿蔔素的功能如表 2-5。

類胡蘿蔔素中的微生物來源，除了像杜氏藻類 *Dunaliella*，酵母菌如 *Phafia rhodozyma*、*Rhodotorula glutinis* 皆是具有商業利益；各種類胡蘿蔔素的微生物來源如表 2-6。目前皆有研究以廉價的替代碳水化合物做為培養基材，例如乳清 (Frengova, Simova et al. 1994)，玉米澱粉水解物(Kesava, An et al. 1998)。

表 2-5 各種類胡蘿蔔素的功能 (孫證雄, 2011)

功能	Carotenoids
轉換為 vitamin A 的前驅物	β -carotene、 α -carotene、 β -cryproxanthin
抗氧化物	all carotenoids
細胞間的通訊系統	β -carotene、canthaxanthin、 β -cryproxanthin
增強免疫力功能	β -carotene
保護皮膚對紫外光的照射	β -carotene、lycopene
眼睛黃斑部的保護	lutein、zeaxanthin

表 2-6 常見類胡蘿蔔素的微生物來源(El-Banna 2012)

Carotenoids	Microorganism
	<i>Blakeslea trispora</i> 、 <i>Dunaliella</i>
β -carotene	<i>Rhodotorula glutinis</i> 、 <i>Flavobacterium</i> 、 <i>Micrococcus</i>
Astaxanthin	<i>Haematococcus sp.</i> 、 <i>Phaffia rhodozyma</i> 、 <i>Chlorella zofingiensis</i>
Lutein	<i>Scenedesmus obliquus</i>

2.2.1 β -胡蘿蔔素(β -carotene)介紹

1831 年 β -胡蘿蔔素是由 Wackenroder 首次分離，而在當時對於其結構仍然是未知之數。直到 1931，其結構是由 Paul Karrer 所建立，他也獲得了第 37 屆諾貝爾化學獎。於 1919 年 Steenbock 提出了 β -胡蘿蔔素和維生素 A 之間的關係，及被人體轉化為維生素分子的全新概念，開啟了 β -胡蘿蔔素在科學和商業上的藍圖。隨著 β -胡蘿蔔素第一個全合成在 1950 年實現，羅氏公司開始商業化生產並且研究進行了整個 70、80 年代，以確定其是否適合在食品中使用及在體內的活性(Coultate 1996)。

β -胡蘿蔔素(β -carotene)，屬於四萜化合物包含了八個異戊二烯(Malisorn and Suntornsuk 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 2-2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(Matelli, da 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。

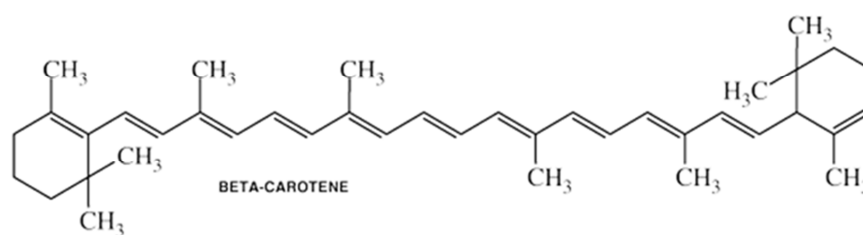


圖 2-2 β -胡蘿蔔素結構

2.2.2 β -胡蘿蔔素的生理活性

β -胡蘿蔔素廣泛分佈於動物、植物及微生物中，然而人體內是無法自行合成的，必須依靠攝取的方式補充， β -胡蘿蔔素先在小腸黏膜中轉換成維生素 A，接著維生素 A 進入肝臟與蛋白質結合，運送至身體各部位或是儲存在肝臟與體脂肪中，而需要時可在肝臟中轉變成維生素 A。 β -胡蘿蔔素又稱為維生素 A 的前體，含有八個異戊二烯單位的四萜化合物，在食品、飼料、化妝品及保健食品等皆有應用。下列為 β -胡蘿蔔素主要功能：

(1) 抗氧化作用

細胞代謝過程中會產生許多活性氧族群，包括超氧自由基(O_2^-)、羥基自由基($OH\cdot$)、單線態氧(1O_2)，皆會導致生物分子如 DNA、脂質和蛋白質的損害，除此之外，還會攻擊多元不飽和脂肪酸，這兩者作用後會產生一連串連鎖反應，不斷地破壞細胞、蛋白質與核酸等，導致諸多慢性疾病(Nishino, Murakosh et al. 2002)。故需攝入適量的抗氧化劑，降低慢性病的風險。如： β -胡蘿蔔素因具有共軛鏈(conjugated chain)結構，利用其分子中含有多個雙鍵能與具有不成對電子的自由基結合來中斷脂質過氧化連鎖反應，進而保護細胞不被破壞，也能有效地防止 DNA 和脂蛋白的氧化損傷，因而能預防冠心病等心腦血管疾病的發生，也可預防老年白內障。

(2) 增強免疫力

β -胡蘿蔔素可增加免疫細胞與巨噬細胞的數量，此類細胞能對抗外來的病菌，故攝取適量的 β -胡蘿蔔素能維持身體正常細胞的運作，也能提高人體對疾病的抵抗能力(張瑛芳, 2005)。

(3) 保護眼睛

在人體視力上需要一種色素稱為視紫來感光，而視紫是由視網醛(維生素 A 的一種型式)與視紫蛋白結合而成，經由光照射，視紫將再度被分解為視紫蛋白與視網醛，如此不間斷地循環，使視力持續正常運作，然而，過程中維生素 A 將會耗損，使得經過大量光照射後，缺乏維生素 A 者，馬上進入黑暗中，視紫將不再合成，促使中斷了影像產生的循環，即成為夜盲症，而 β -胡蘿蔔素是維生素 A 的前體在需要時可在肝臟中轉變維生素 A，因此 β -胡蘿蔔素具有保護眼睛的功能(張瑛芳, 2005)。

2.2.3 影響β-胡蘿蔔素產量因子

類胡蘿蔔素的產率以及形成類胡蘿蔔素的各種類型、濃度皆與菌種、培養基與環境因子等條件有關(Margalith and Meydav 1968)。以下介紹幾種與β-胡蘿蔔合成有關的因子，如溫度、pH、光、溶氧量、培養基組成物，誘導物等。

2.2.3.1 溫度

在培養環境上，溫度對於*R. glutinis*的生長和產物積累為重要的影響因素，由於溫度的高低會直接影響酵素的反應，故間接與菌體的生長和產物有關係，文獻中指出原核細胞與真核細胞中許多酵素的作用與類胡蘿蔔素的合成有相關，如：八氫番茄紅素脫氫酶(phytoene desaturase)、β-胡蘿蔔素羥化酶(β-carotene hydroxylase)及番茄紅素環化酶(lycopene cyclase)皆在高於30 °C下方能激發酵素活性(Malisorn and Suntornsuk 2008)；(Zhang, Zhang et al. 2014)，但溫度高於35°C時，不利*R. glutinis*的生長，而溫度低於20°C，菌體生長速率非常遲緩，因此必需視菌體最佳的培養溫度而定。

2.2.3.2 pH 值

培養基中酸鹼值的改變會影響細胞內外的離子平衡以及與菌體生長酵素，使得菌體的生長及產物有所影響，而在文獻中指出在偏鹼的環境下有利於*R. glutinis*的生長(Aksu and Eren 2007)，但在偏酸的環境下能獲得較高的油脂累積(Johnson, Singh et al. 1992)與β-胡蘿蔔素(Luo, Niu et al. 2013)。

2.2.3.3 白光

太陽光有利於生物體生長，但也可能極其有害；自然環境中，氧氣是以三重態氧(³O₂)的形式存在，但在強烈的太陽照射下將促使氧氣的能量傳遞形成單線態氧(¹O₂)的狀態，使得一些非光合細菌或真菌啟動防光損害的機制，也就是類胡蘿

蔔素的合成(Tada and Shiroishi 1982)；(Weeks, Saleh et al. 1973)；(Sakaiu, Nakanishi et al. 2001)；類胡蘿蔔素對於生物體，其抵抗光氧化的作用具有相當重要性(Marova, Carnecka et al. 2012)，文獻中也指出在照光下，有助於 *R. glutinis* 生長以及類胡蘿蔔素的合成，然而不利於油脂累積(Zhang, Zhang et al. 2014)。

2.2.3.4 溶氧量

發酵液中的溶氧濃度(Dissolved Oxygen, 簡稱 DO)對微生物的生長和產物的形成有著重要的影響。在發酵的過程中，必須供給適量的無菌空氣，菌體才能繁殖和累積所需的代謝產物。不同菌種及不同發酵階段的菌體之需氧量是不同的，發酵液的 DO 值直接影響微生物之酵素的活性、代謝途徑及產物產量。發酵過程中，氧氣的質傳速率主要受發酵液中溶解氧的濃度和傳遞阻力等影響(張智勇,2011)。

文獻(Mantzouridou, Roukas et al. 2005)中指出好氧微生物在足夠的氧氣傳遞(Oxygen Transfer Rate, 簡稱 OTR)能有良好的生長以及有利於生產 β -胡蘿蔔素，並且從實驗中發現隨著氧氣質傳速率提升，發酵液中的過氧化氫濃度也隨之提升，進而產生如超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, 簡稱 SOD)等酵素，促使 *Blakeslea trispora* 合成 β -胡蘿蔔素來抵抗氧化反應，然而在過高的氧氣質傳速率下，菌體無法負荷較高濃度的過氧化氫，使得 β -胡蘿蔔素反而下降，故研究溶氧量對發酵的影響，以及控制對提高生產效率，改善產品產質等都有重要的意義(Ping, Mingzhe et al. 2007)。

2.2.3.5 碳源和氮源

碳源是供應細胞組成與能量的主要來源，微生物在利用碳源上大致分為兩類，(1)異營微生物，使用有機碳源，如：碳水化合物(carbohydrates)、油脂(lipids)、

碳氫化合物(hydrocarbons)，(2)自營微生物，使用如二氧化碳(CO₂)作為碳源；而在文獻上指出能利用廉價的廢棄物替代碳水化合物做為培養基材，如：生質柴油工廠的副產物粗甘油(Cutz, Coi et al. 2013)，故使用粗甘油對 *R. glutinis* 進行培養能有進一步探討。

氮源是構成細胞的蛋白質、核酸的主要元素之一，並且分為兩部分，(1)有機氮，如：酵母萃取物(Yeast extract)、黃豆粉、尿素、玉米漿等，(2)無機氮源，如：銨鹽與其他含氮的無機鹽類如氯化銨、磷酸二氫銨、硝酸銨、硫酸銨等。

在代謝路徑上，碳氮源比例(C/N)對於細胞生長扮演了很重要的角色，文獻中指出在 C/N 比高的狀態下，能提升油脂的累積(Saenge, Cheirsilp et al. 2011)，再更進一步探討，由於類胡蘿蔔素與油脂的代謝路徑上皆有乙酰輔酶 A(acetyl CoA)為前驅體，故在改變 C/N 比上對於 *R. glutinis* 的代謝產物會有所影響(Braunwald, Schwemmlin et al. 2013)。

2.2.3.6 無機鹽與微量元素

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 (Wu, Siguo 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(張智勇, 2011)。

2.2.3.7 誘導物

好氧微生物在代謝過程中皆會產生許多活性氧族群(reactive oxygen species, ROS)，包括超氧自由基(O_2^-)、羥基自由基($OH\cdot$)、過氧化氫(H_2O_2)等，為了抵抗氧化，進而促使抗氧化酵素的合成，並誘導微生物生產類胡蘿蔔素等抗氧化物；有許多研究將細胞暴露在各種氧化壓力下，誘導抗氧化酵素的合成，如：添加甲萘醌 (menadione)(Yan, Hua et al. 2006)、乙醇(ethanol)(Gu, An et al. 1997)、過氧化氫(peroxide)(Yan, Liang et al. 2011)，或是利用照光反應將穩定的氧原子激發形成單線態氧(ligusa, Yoshida et al. 2005)，結果顯示是有助於抗氧化酵素合成，但添加誘導物的濃度需適量的控制，避免菌體在生長初期便遭氧化破壞，故添加誘導物的時間點也將成為考量因素之一。

2.2.4 β -胡蘿蔔素的生產

β -胡蘿蔔素具有相當大的市場，其價值在 2004 年為 2.42 億美元，至 2009 年上漲至 2.53 億美元(BBC Search)，在全球製造 β -胡蘿蔔素可分為化學合成、生物合成、天然物萃取以及酶提取法，目前以化學合成的方式佔有 84.8%，所生產出的 β -胡蘿蔔素結構皆為全反式結構，以藻類合成的方式佔有 8.5%，其中杜氏藻所產出的 β -胡蘿蔔素分別佔有 40% 的全反式、50% 的 9-順式(Ye, Jiang et al. 2008)； β -胡蘿蔔素的功用會因結構不同有所影響，其結構如圖 2-3，可分為全反式(all-trans β -carotene)、9-順式(9-cis β -carotene)、13-順式(13-cis β -carotene)以及 15-順式(15-cis β -carotene)，其中以 9-順式(9-cis β -carotene)是具有較好的生物利用度與高活性氧清除效果；以下為生產 β -胡蘿蔔素之菌種介紹(2000, Ye, Jiang et al. 2008, 趙婷, 林孔亮 et al. 2010)：

(1) 杜氏藻(*Dunaliella salina*)

杜氏藻(*Dunaliella salina*，又名鹽生杜氏藻)是一種耐鹽單細胞的綠藻，屬於綠藻綱，與高等植物相比具有簡單快速地培養優勢。在適宜的條件下，杜氏藻具有很高的含量 30~50 mg/g (β -carotene/ dry cell weight)，且沒有堅硬的細胞壁，具有杯狀葉綠體，與高等植物的葉綠體相似。除此之外，其生長在高鹽濃度環境中，需要碳酸氫鹽作為碳源，以及硝酸鹽、硫酸鹽和磷酸鹽等其他營養物質。另外在高光強度下，通過光合作用密切參與，以及受到有機分子的氧化破壞與光誘導下，能促使 β -胡蘿蔔素生產，因此，杜氏藻最適合生長在富含鹽和其他營養物質的環境下，並且對於 β -胡蘿蔔素的生產，光是必須的條件。

在萃取部分，FDA 已認可杜氏藻的藻體可直接用作食物或飼料，並可使用食用油或是食品安全級有機溶劑從杜氏藻中提取的 β -胡蘿蔔素，例如：用橄欖油提取 β -胡蘿蔔素可用在藥物配方中。

目前，市場上存在很多不同種類的杜氏藻源的 β -胡蘿蔔素產品，在印度、以色列和美國都是杜氏藻的主要生產地，經由純化過的 β -胡蘿蔔素大部分以 10~200 g/L 的含量分散在植物油中出售，可作為添加劑和著色劑應用也可製成軟膠囊。

(2) 三孢布拉黴(*Blakeslea trispora*)

在原始生態中，*Blakeslea trispora* 是與熱帶植物共生的黴菌，分為正株和負株兩種類型。正株合成三孢子酸(trisporic acid)，為 β 胡蘿蔔素的前體，兩種類型以特定比例合成大量的 β -胡蘿蔔素。

從 *Blakeslea trispora* 生產 β -胡蘿蔔素首次嘗試是在 1995 年，使用老鼠進行的動物實驗和對最終產品中 4 種真菌毒素的酶聯免疫法測定，以老鼠的致病性為檢測標準，已經證實 *Blakeslea trispora* 沒有致病性和毒性。生產過程是由 GMP 的程序，適當的衛生控制，並且原料的適當控制以及生物量和最終的結晶產品符合化學和微生物規格，最終結晶產品亦符合 JECFA 和歐盟規範載於指令 95/45/EC，歐盟科學委員會認為 *Blakeslea trispora* 發酵所得到的 β -胡蘿蔔素與由化學合成品在做為食品著色劑時具有相當的作用，因此，可做為食品著色劑使用。

目前，在俄羅斯、烏克蘭和西班牙均有由 *Blakeslea trispora* 生產 β -胡蘿蔔素的工業生產，其產品的含量已經達到 3 g/L 的培養液。

(3) 布拉克須黴(*Phycomyces blakesleeanus*)

布拉克須黴(*Phycomyces blakesleeanus*)也屬於真菌，也是 β -胡蘿蔔素的一種重要來源。在適宜條件下，野生型菌株中 β -胡蘿蔔素的含量大約在 0.05 mg/g (β -carotene/ dry cell weight)。有些突變株能夠積累到 10mg/g (β -carotene/ dry cell weight)，在工業生產中，通常使用發酵桶培養布拉克須黴。

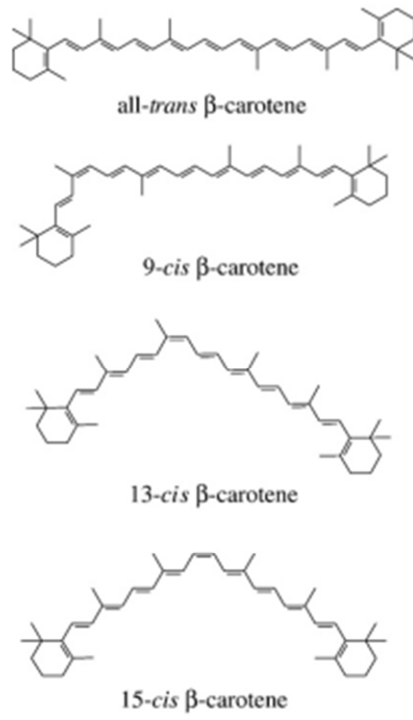


圖 2-3 β-胡蘿蔔素的結構

2.3 粘紅酵母菌(*Rhodotorula*)簡介

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; 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。

某些紅酵母屬中的菌種是主要生產類胡蘿蔔素, 如 β -胡蘿蔔素、紅酵母烯(torulene)和圓紅酵母烯(torularhodin)(Marova, Carnecka et al. 2012)。此外, 它們被視為蛋白質, 脂類和維生素的良好來源(Roadjanakamolson and Suntornsuk 2010); 紅酵母屬物種是好氧酵母, 具特有的代謝特性, 例如在指數生長期具有產生糖原的能力, 並在靜止生長期大量累積脂類和類胡蘿蔔素色素, 除此之外, 紅酵母的單細胞性質和高生長率的特性, 使它適於大規模發酵(Dworecka-Kaszak and Kizerwetter-Swida 2011)。

2.3.1 菌種選擇-粘紅酵母菌(*Rhodotorula glutinis*)

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

除此之外，*R. glutinis*也是具有生產β-胡蘿蔔素的菌株，文獻上指出，粘紅酵母是可積累相當含量的類胡蘿蔔素，即紅酵母烯(torulene)和圓紅酵母素(torularhodin)，這兩者具有β-胡蘿蔔素一半的潛力(Ershov Iu, Dmitrovskii et al. 1992)，在應用上也有文獻指出能利用殘餘的酵母細胞團作為提取的色素後的動物飼料(Matelli, da Silva et al. 1990)，因此培養*R. glutinis*能在能源和食品上皆具有相當的發展性。

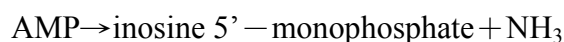
2.4 微生物產油脂與產 β -胡蘿蔔素機制

黏紅酵母菌是含油酵母菌之一，其代謝產物包含了微生物油脂以及 β -胡蘿蔔素，以下分別介紹生產油脂與生產 β -胡蘿蔔素之合成路徑，在脂肪酸合成的過程中包含兩個部分，如圖 2-4 (Ratledge 1991): 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。

I. 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。

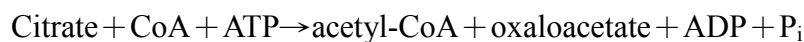
2. 隨著 AMP deaminase 活性上升，細胞內與粒線體中的 AMP 濃度下降。



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

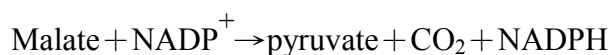
4. isocitrate dehydrogenase 的停止，造成 isocitrate 無法被代謝而且藉著 Aconitase 與 citric acid 達成平衡。

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:



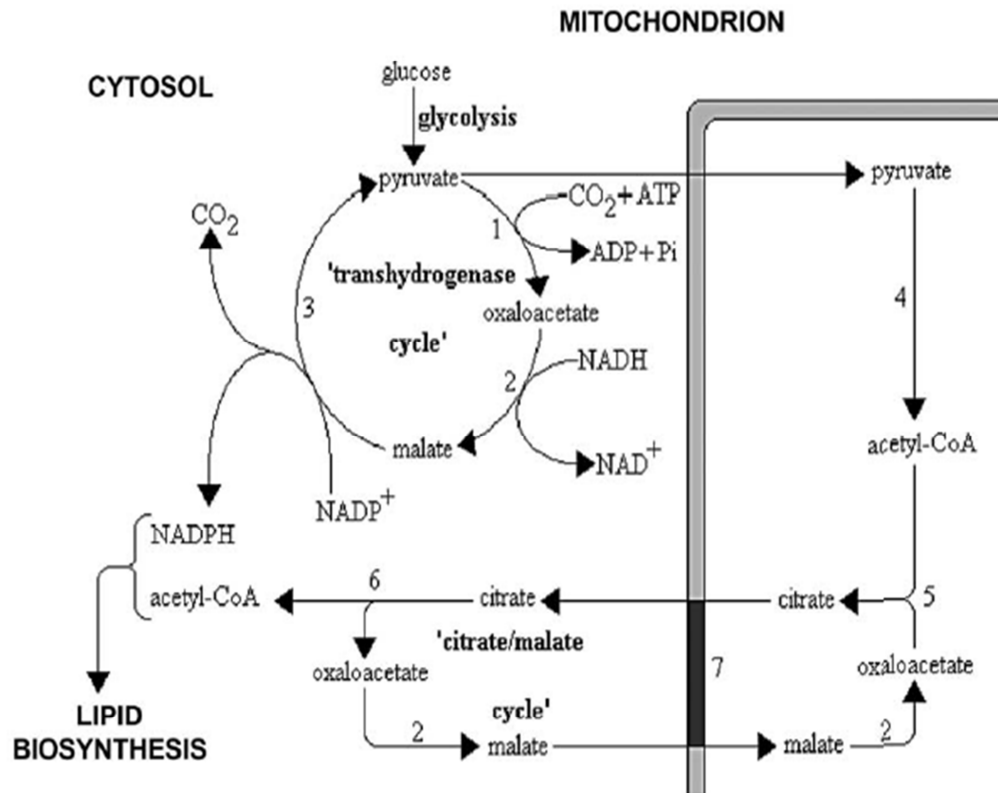


圖 2-4 A scheme to show how the citrate/malate cycle and the cytosolic 'transhydrogenase' cycle could provide sufficient precursors of acetyl-CoA and NADPH for lipogenesis in oleaginous microorganisms. Enzymes: 1, pyruvate decarboxylase; 2, malate dehydrogenase; 3, malic enzyme; 4, pyruvate dehydrogenase;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

綜合以上，可由圖 2-5 表示整個油脂（脂肪酸）的累積機制：

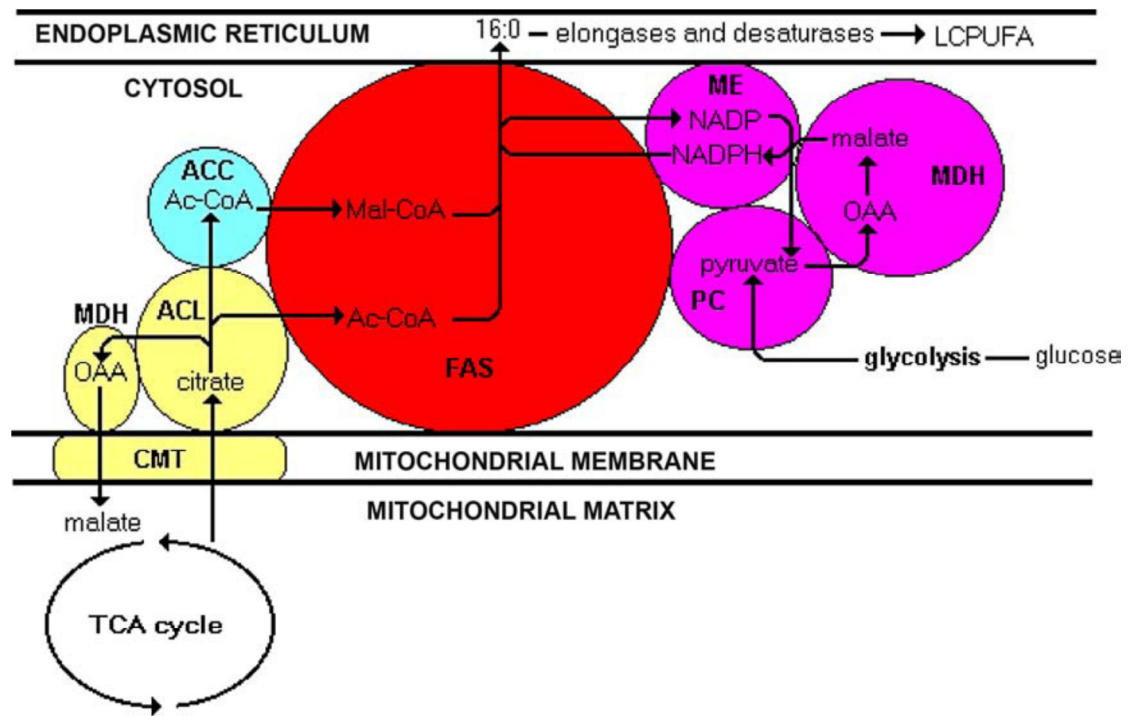


圖 2-5 A diagram to show the organisation of a hypothesised lipogenic metabolon.

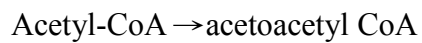
The flux of carbon from the mitochondrion, via citrate efflux and acetyl-CoA formation in the cytosol, thence into fatty acids and finally into chain PUFAs (LCPUFA) occurring in the membranes of the endoplasmic reticulum, is shown by the continuous lines. The system uses pyruvate (from glycolysis) as the provider of intramitochondrial acetyl-CoA and for citric acid production as is shown in 圖 2-3 but which is not repeated here for clarity. OAA:oxaloacetate; AC-CoA:acetyl-CoA; Mal-CoA: malonyl-CoA; FAS: fatty acid synthase; ACL:ATP:citrate lyase; ACC: acetyl-CoA carboxylase; CMT: citrate/malate translocase; ME: malic enzyme; PC: pyruvate carboxylase; MDH: malate dehydrogenase. The 'yellow' enzymes from the citrate/malate cycle while the 'purple'enzymes represent the cytosolic transhydrogenase cycle. (Ratledge 1991)

在 β -胡蘿蔔素合成過程中， acetyl-CoA 也是合成 β -胡蘿蔔素的前驅物，而其代謝路徑分為兩種(1) Mevalonate pathway 以及 *R. glutinis* 整體代謝路徑，如圖 2-6(Zhu, Zhang et al. 2012)：

1. 足夠的 citrate 進入細胞質後，被 ATP:citratelase 切斷產生了 acetyl-CoA 和 oxaloacetate。



2. 在 mevalonate pathway，. 酵素 Tiolase 將 2 個 Acetyl-Co 生成 acetoacetyl CoA



3. 接著經由 phytoene formation(八氫番茄紅素的形成)、desaturation(減飽合作用)、cyclisation(環化作用)形成 β -胡蘿蔔素

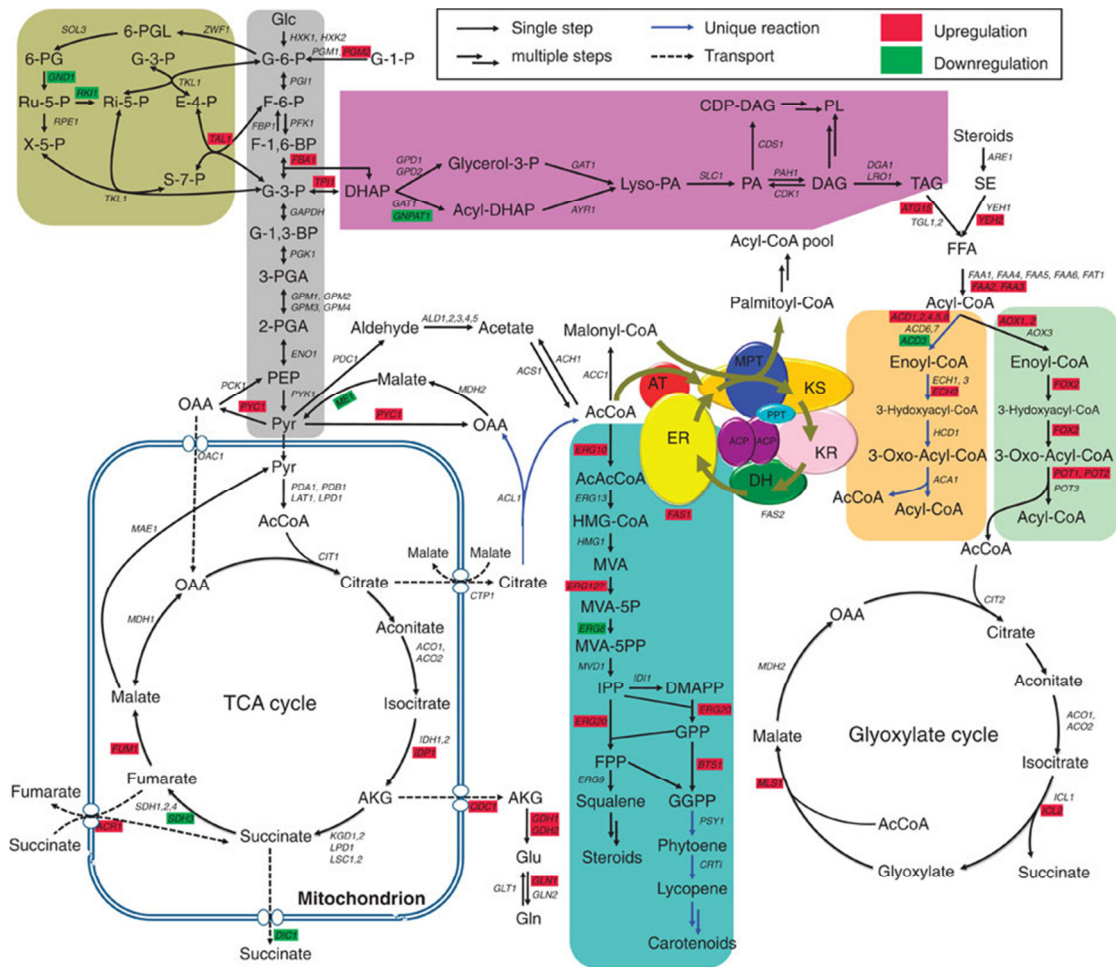


圖 2-6 Reconstruction of central and lipid metabolism pathways of *R. glutinis* .

The metabolic network that was reconstructed from the KEGG pathway and SGD annotation (<http://www.yeastgenome.org/>) included glycolysis (grey), the pentose phosphate pathway (olive), the TCA cycle, fatty acid de novo synthesis, isoprenoid biosynthesis (blue), triacylglycerol and phospholipid biosynthesis (purple) and lipolysis, β -oxidation in mitochondria (orange) or peroxisomes (pale green) and the glyoxylate cycle. Metabolic reactions that were present in *R. toruloides* but absent in *S. cerevisiae* are indicated with blue arrows, and upregulation and downregulation of genes in response to nitrogen depletion are highlighted in red and green, respectively. Abbreviations for the components of the fatty acid synthase system are ACP, acyl carrier protein; AT, acyltransferase; DH, dehydratase; ER, enoyl reductase; KR, ketoacyl reductase; KS, ketoacyl synthase; MPT, malonyl / palmitoyl transferase; PPT, phosphopantetheine transferase. More abbreviations, gene symbols, annotations and expression abundance data are included in Supplementary Tables S8 and S9 .

(2) 細菌、藻類以及植物皆以 Non-mevalonate pathway 作為代謝路徑來合成 geranylgeranyl pyrophosphate(GGPP)，接著再以相同方式 phytoene formation(八氫番茄紅素的形成)、desaturation(減飽合作用)、cyclisation(環化作用)形成 β -胡蘿蔔素，Non-mevalonate pathway 如圖 2-7(Ye, Jiang et al. 2008)：

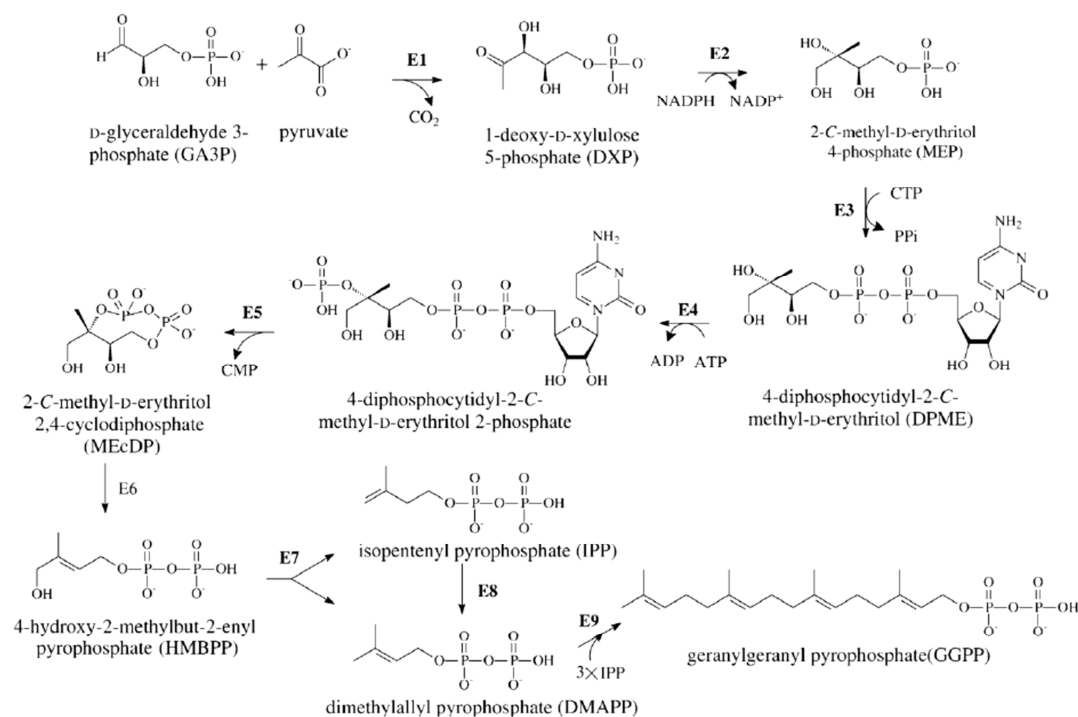


圖 2-7 The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis pathway for the generation of geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP).

E1–E9 are the enzymes for relative reactions.

E1:1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, DXS;

E2:1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, DXR;

E3:4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol (DPME) synthase, CMT;

E4:DPME kinase, CMK;

E5:2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase, MEcPS;

E6:(E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl pyrophosphate synthase;

E7:(E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl pyrophosphate reductase;

E8:isopentenyl pyrophosphate (IPP) isomerase, Ipi;

E9:geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGPS.

2.5 發酵策略

2.5.1 批次發酵策略

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。

2.5.2 饋料發酵策略

饋料發酵(fed-batch)是指在批次發酵過程中，間歇或連續地加入培養基的方法，是一種介於批次與連續式發酵的過度發酵方式。饋料是生物程序中最普遍的補料方式，是用來調整在發酵反應器中基質或產物濃度。而饋料批次的優點，在於可以有效避免基質或產物所造成的抑制現象，且可以有效的提升生產速率。但因為在發酵期間連續或間歇性饋料，所以工作體積會持續增加至反應器體積上限。

2.5.3 指數型饋料發酵策略

指數型饋料是保持菌體生長速率的饋料方式，其饋料的時間點必須仰賴於細胞的成長速率，並假設批次饋料的速率會與菌體消耗碳源的速率相同，並且達到質量平衡的條件而得到下列公式；再決定饋料速率前，需將批次實驗中所得到的最大生物量、比生長速率、發酵培養基之體積、生物產量等條件，以及將饋料的培養基濃度帶入公式進行運算，最終固定饋料時間間距，便能得到在時間間距內所需饋料的速率方能符合細胞生長所消耗碳源的速率，保持細胞穩定的成長；指數型饋料的優點在於能控制細胞成長的關鍵，此能提升體積生產率、細胞濃度以

及細胞生產速率等，並藉此能提升產物的生產速率(Cheng, Wu et al. 2002)。

$$FS_0 = \frac{\mu X_0 V_0 e^{\mu t}}{Y_{X/S}}$$

F：體積饋料流速，L/hr

S₀：饋料濃度，g/L

μ：比生長速率，1/hr

X₀：批次發酵所得的最大生物量，g/L

V：發酵培養基之體積，L

Y_{X/S}：每克基質生成每克生物量之產量、g/g

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。

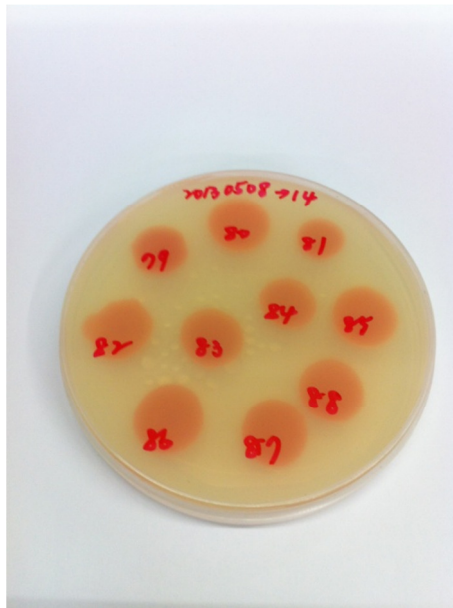


圖 3-1 *Rhodotorula glutinis* 在 agar plate 上之外觀

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
工業級粗甘油	Crude glycerol	又華股份有限公司
甘油	Glycerol	SHOWA
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
過氧化氫	Hydrogen peroxide	聯工化學試藥
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

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	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
超純水系統	Thermo	Smart2Pure
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	
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
試管震盪器	IKA	MS1 minishaker

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
T5 日光燈座	T5-8W/D 110V	SUN
LED 燈	MR16-7W	
光度計	LI-COR	LI-250A

3.3 分析方法

3.3.1 光照強度測定方法

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

3.3.2 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 蒸餾水，經試管震盪器使菌體與蒸餾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)。

3.3.3 葡萄糖濃度分析方法

將菌液置入離心管中，用離心機以轉速 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。

3.3.4 總脂質濃度分析方法

秤取冷凍乾燥後的菌體 50 mg，加入甲醇/氯仿(1:2)溶液 5 ml 以試管震盪器混合均勻，並以超音波破碎機進行破碎 (功率 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)。

3.3.5 β -carotene 分析方法

秤取冷凍乾燥後的菌體 50 mg，加入乙腈/異丙醇/乙酸乙酯(40:40:20，v/v)溶液 2 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)，靜置萃取 1 hr 後，再經由離心機以轉速 7000 rpm 離心 10 min。取出上清液，並使用 0.45 μ m 針筒過濾器過濾。

利用 HPLC (Hitachi UV detector L-2400, Hitachi pump L-2130, Hitachi Autosampler L-2200, Hitachi High-Technology Corporation, Japan)分析 β -carotene 的濃度，分析條件：管柱 C18 (Vercopak N5ODS, 250 mm \times 4.6 mm, Taiwan)，移動相之混合液為乙腈/異丙醇/乙酸乙酯 (40:40:20，v/v)，流速 0.7 mL/min，偵測波長 457 nm，注射量 20 μ L。

3.3.6 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 μ m 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 \times 4.6 mm, Taiwan)，移動相為 0.01 N H₂SO₄，流速 0.4 mL/min，注射量 50 μ L。

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)

表 3-4 發酵培養基

Compounds	Concentration (g/L)
Glucose	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 g/l

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。

3.4.3.1 C/N 比

依照表 3-4 發酵培養基條件，僅改變 C 源(Glucose)濃度與 N 源($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)濃度，如下表 3-5 C/N 比培養基，並以 1N HCl 調整 pH 值至 5.5，即為搖瓶 C/N 比發酵培養基。

表 3-5 C/N 比培養基

C/N ratio	Glucose conc. (g/L)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ conc. (g/L)
18.4	30.0	2.0
23.6	60.0	4.0
36.8	60.0	2.0
51.1	60.0	1.0
73.7	120.0	2.0

3.4.4 發酵槽發酵培養基 (Fermentation medium, FM)

表 3-6 發酵培養基

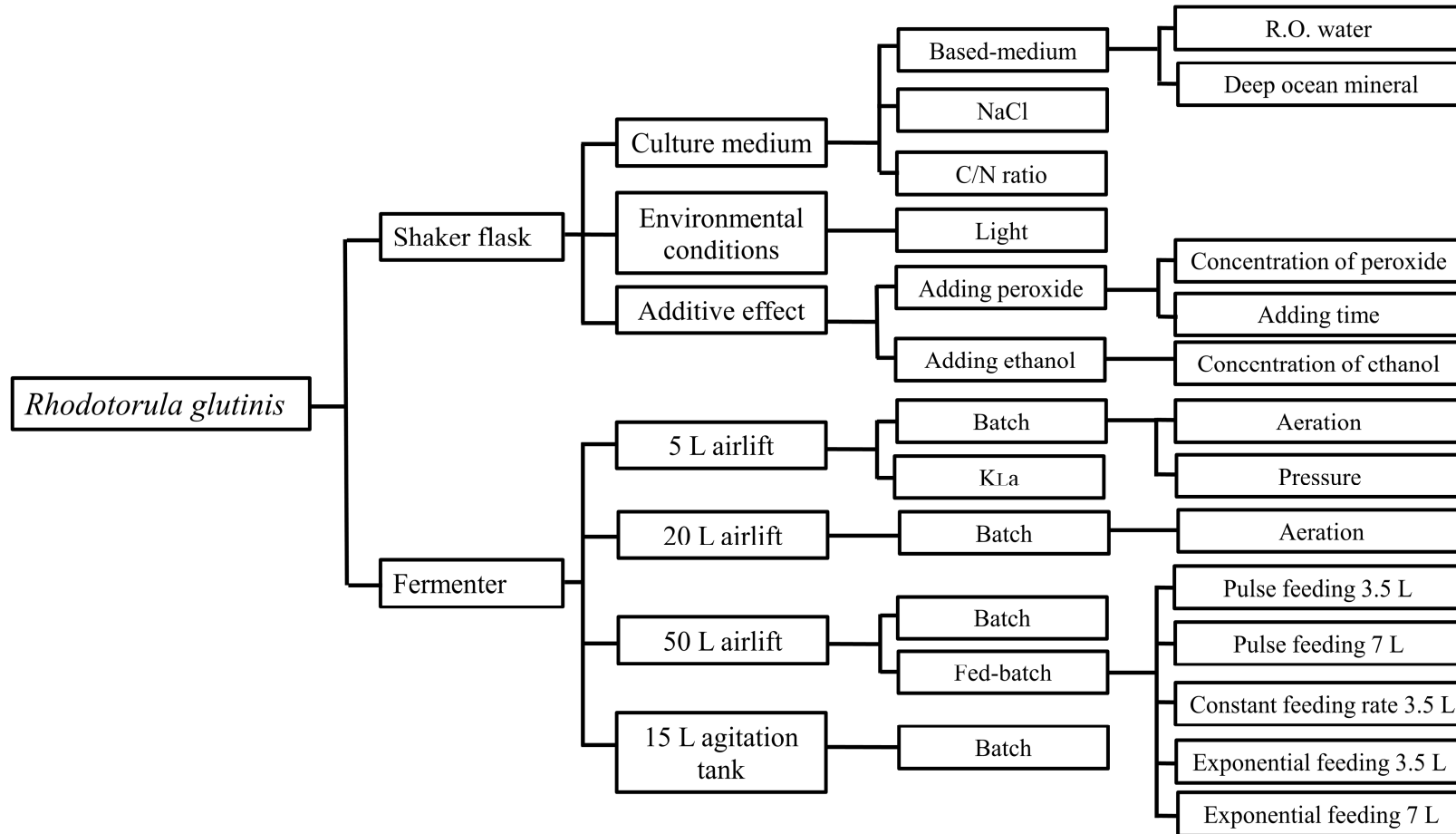
Compounds	Concentration (g/L)
Crude glycerol	60.0
Yeast extract	2.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
CaCl ₂	0.1
NaCl	0.1

依表 3-6 發酵培養基之比例配製，並以 1 N HCl 調整 pH 值為 5.5。

3.4.5 接菌

將培養 24 hr 之 Seed medium 接至 Fermentation medium 中，搖瓶、5 L airlift、20 L airlift 部分之接菌量為 Fermentation medium 10%之體積，50 L airlift 部分之接菌量為 Fermentation medium 1%之體積。

3.5 實驗架構



3.6 實驗培養條件

3.6.1 搖瓶批次發酵程序 (Flask Experiments)

3.6.1.1 不同培養基介質之影響

目的：探討使用不同溶劑（逆滲透蒸餾水、海洋深層水）對於菌體生長、脂質累積與 β -carotene 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. 分別以逆滲透蒸餾水、海洋深層水做為溶劑，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 48 hr。

3.6.1.2 C/N 比之影響

目的：探討以不同的 C/N 比對於菌體生長、脂質累積與 β -carotene 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. 以逆滲透蒸餾水作為溶劑，並依照表 3-5 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 48 hr。

3.6.1.3 照光之影響

目的：探討有無光照對於菌體生長、脂質累積與 β -carotene 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. 以逆滲透蒸餾水作為溶劑，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. 控制組於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 48 hr。
5. 照光組之光強度為 $38.18 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ，並且於轉速 150 rpm、溫度 24°C 培養箱中，培養 48 hr。

3.6.1.4 添加過氧化氫濃度之影響

目的：探討添加不同濃度的過氧化氫對於菌體生長與 β -carotene 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. 以逆滲透蒸餾水作為溶劑，並依照表 3-4 配製 50 ml 培養基。
3. 分別添加不同濃度的過氧化氫（0 mM、0.25 mM、0.5 mM、1mM）於培養基中。
4. 再以 10% 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。

3.6.1.5 添加過氧化氫時間點之影響

目的：探討於不同時間點下添加過氧化氫對於菌體生長與 β -carotene 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. 以逆滲透蒸餾水作為溶劑，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. 於培養 48 hr 時添加 0.25 mM 過氧化氫。
5. 分別於 60 hr、72 hr 取樣。

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

3.6.2.1 通氣量之影響

目的：探討改變通氣量 (1vvm、1.5 vvm、2 vvm、2.5 vvm) 對於菌體生長、脂質累積與 β -carotene 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. 以逆滲透蒸餾水作為溶劑，並依照表 3-6 配製 5000 ml 培養基。
3. 接種 10 % SM 於上述培養基中。
4. 分別以不同通氣量 (1vvm、1.5 vvm、2 vvm、2.5 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. 每 12 hr 取樣一次。

3.6.2.2 壓力之影響

目的：固定通氣量為 1.5 vvm，探討改變壓力（0 atm、0.2 atm、0.5 atm）對於菌體生長、脂質累積與 β -carotene 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. 以逆滲透蒸餾水作為溶劑，並依照表 3-6 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，分別以不同通壓力（0 atm、0.2 atm、0.5 atm），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. 每 12 hr 取樣一次。

3.6.3 20 L 氣舉式批次發酵程序 (Fermentation Experiments)

3.6.3.1 通氣量之影響

目的：探討改變通氣量（0.75 vvm、1.25 vvm、1.5 vvm）對於菌體生長、脂質累積與 β -carotene 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. 以逆滲透蒸餾水作為溶劑，並依照表 3-6 配製 18 L 培養基。
3. 接種 10% SM 於上述培養基中。
4. 分別以不同通氣量（0.75 vvm、1.25 vvm、1.5 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. 每 12 hr 取樣一次。

3.6.4 15 L 攪拌式批次發酵程序 (Fermentation Experiments)

目的：在相同條件下，探討使用不同發酵槽對於 *Rhodotorula glutinis* 菌體生長、脂質累積與 β -carotene 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. 以逆滲透蒸餾水作為溶劑，並依照表 3-6 配製 10 L 培養基。
3. 接種 10 % SM 於上述培養基中。
4. 通氣量 1.5 vvm、溶氧 30 %、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. 每 12 hr 取樣一次。

3.6.5 50 L 氣舉式批次饋料發酵程序 (Fermentation Experiments)

目的：探討不同的饋料方式對於菌體生長速率、脂質累積速率與 β -carotene 生產速率之影響。

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. 以逆滲透蒸餾水作為溶劑，並依照表 3-6 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 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. 於培養 48 hr 時進行饋料。
6. 依照表 3-7 饋料培樣積與方式來進行饋料，並且每 12 hr 取樣一次。

表 3-7 饋料培養基與方式

饋料方式	一次性饋料 (Pulse feeding)	等速饋料 (Constant feeding)	指數型饋料 (Exponential feeding)
饋料方式	短時間內將碳源一次饋入發酵槽中。	於 12 hr 內，以 0.3 l/hr 等速下進行饋料。	利用前 48 hr 得到的批次數據，代入公式 $FS_0 = \frac{\mu X_0 V_0 e^{\mu t}}{Y_{x/s}}$ 中，可得到饋料體積流速 (F) 與時間 (t) 的關係式，並且於 12 hr 內，以每 2 hr 作為時間間距所得到的饋料速率進行饋料。
配製方式	取 2400 g 粗甘油至 5 L 血清瓶，並使用 HCl 調整 pH 至 5.5，饋料之總體積為 3.5 L。 取 4800 g 粗甘油至兩瓶 5 L 血清瓶，並使用 HCl 調整 pH 至 5.5，饋料之總體積為 7 L。		

註：Exponential feeding $FS_0 = \frac{\mu X_0 V_0 e^{\mu t}}{Y_{x/s}}$

F：體積饋料流速，L/hr

S₀：饋料濃度，g/L

μ：比生長速率，1/hr

X₀：批次發酵所得的最大生物量，g/L

V：發酵培養基之體積，L

Y_{x/s}：每克基質生成每克生物量之產量、g/g

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、20 L 氣舉式發酵槽、15 L 攪拌式發酵槽以及 50 L 氣舉式發酵槽。

3.7.1 搖瓶發酵培養裝置圖

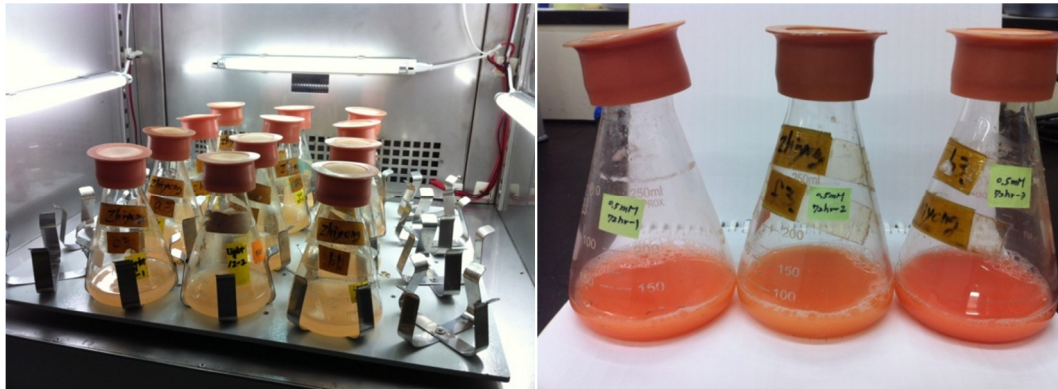


圖 3-2 *Rhodotorula glutinis* 之搖瓶實驗裝置圖

3.7.2 5 L 氣舉式與 20 L 氣舉式批次發酵培養裝置圖

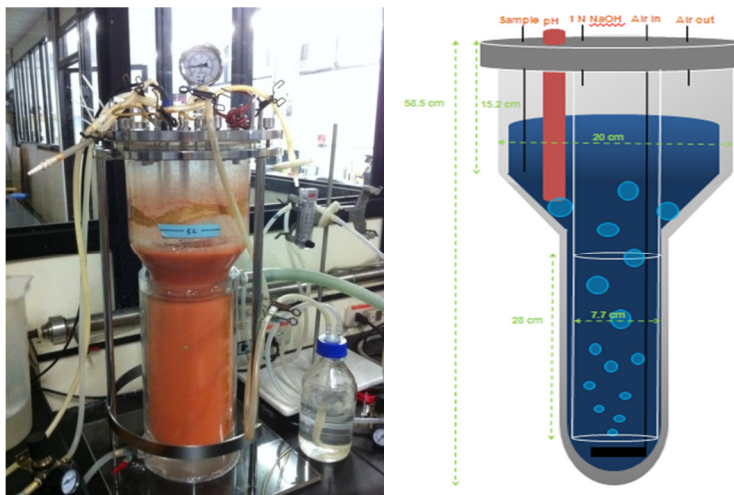


圖 3-3 5 L 氣舉式發酵槽裝置圖

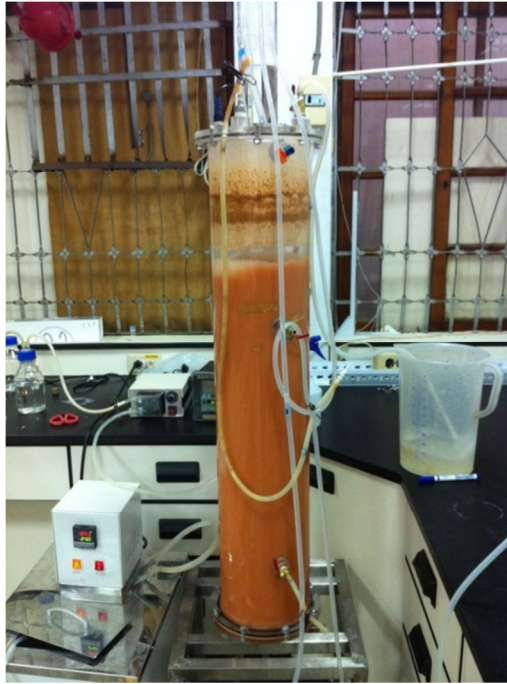


圖 3-4 20 L 氣舉式發槽裝置圖

3.7.3 15 L 攪拌式批次發酵培養裝置圖



圖 3-5 15 L 攪拌式發酵槽裝置圖

3.7.4 50 L 氣舉式饋料發酵培養裝置圖



圖 3-6 50 L 氣舉式發酵槽裝置圖

第四章 結果與討論

4.1 搖瓶批次發酵程序

為了能有效提升 β -胡蘿蔔素的含量，本實驗使用搖瓶培養 *Rhodotorula glutinis*，分成三大部分探討對 β -胡蘿蔔素含量的影響：(1)改變培養基、(2)環境因子及(3)添加劑。

4.1.1 不同培養基介質之影響

由於台灣四面環海，海水資源相當豐富，所以本實驗利用海洋深層水所富含的礦物質對於 *Rhodotorula glutinis* 生長、油脂累積及 β -胡蘿蔔素含量之影響做簡單的探討，分別為：逆滲透蒸餾水含有機氮、海洋深層水含有機氮、海洋深層水不含有機氮。實驗結果如圖 4-1，含有有機氮部分，控制組之 β -胡蘿蔔素含量相較於海洋深層水略高 0.7 mg/g，這部分推測在含有有機氮時，海洋深層水中的礦物質較有利於生長生物量，反而在累積油脂及 β -胡蘿蔔素的部分略為下降；以海洋深層水為培養基介質上，含有有機氮所得到的菌體濃度是不含有機氮組的 2 倍，然而在累積油脂上，不含有機氮組能明顯提高 78.51 %。

結論，海洋深層水中的礦物質有利於生物量生長，在不含有機氮下，其礦物質能提升油脂的累積，然而與文獻(Bhosale and Gadre 2001)中所得結果不符，推測在各地所取得的海水會因地理位置不同而得到的礦物質成分比例大有不同，所以本實驗之 *R. glutinis* 在這樣的條件下會先行合成油脂，而 β -胡蘿蔔素的含量並無有效提升。

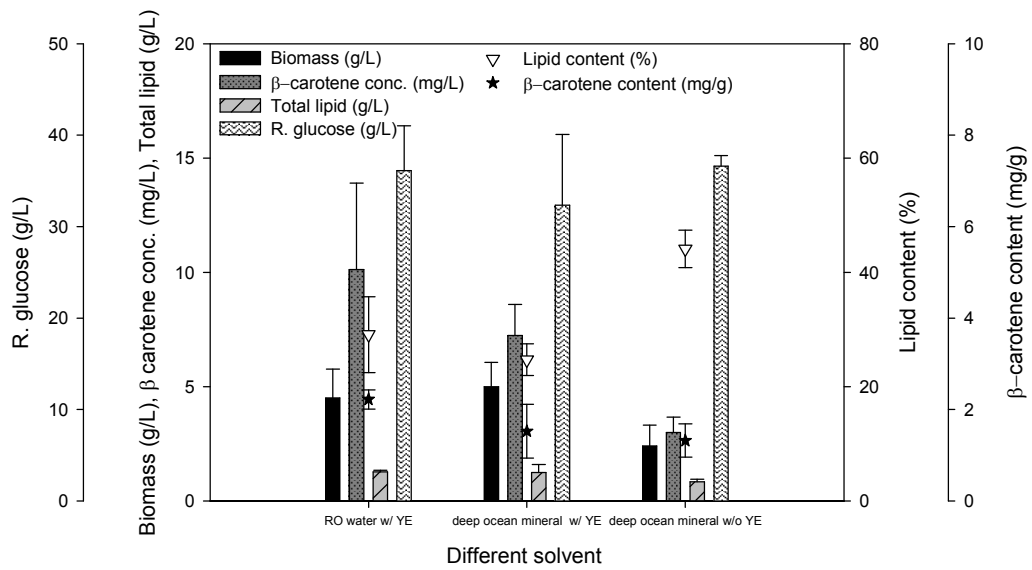


圖 4-1 改變培養基介質(逆滲透蒸餾水含 Yeast extract、海洋深層水含 Yeast extract、海洋深層水不含 Yeast extract)培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-1 改變培養基介質(逆滲透蒸餾水含 Yeast extract、海洋深層水含 Yeast extract、海洋深層水不含 Yeast extract) 培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長影響之實驗數據

Based-medium	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	β- carotene content (mg/g)	β- carotene conc. (mg/L)
RO water w/ yeast extract	2.69 ± 0.30	4.50 ± 1.27	29.12 ± 6.63	1.27 ± 0.07	2.22 ± 0.21	10.13 ± 3.77
Sea water w/ yeast extract	2.25 ± 0.14	5.00 ± 1.06	24.71 ± 2.77	1.24 ± 0.35	1.53 ± 0.59	7.25 ± 1.35
Sea water w/o yeast extract	2.70 ± 0.01	2.40 ± 0.92	44.11 ± 3.27	0.83 ± 0.13	1.32 ± 0.36	2.99 ± 0.68

4.1.2 鹽度之影響

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 35 g/L(National Oceanographic Data Center)，故本實驗探討氯化鈉(NaCl)對 *Rhodotorula glutinis* 生長之影響，五種鹽度濃度分別為 0.1(控制組)、10、20、30、40 g/L。實驗結果如圖 4-2，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。

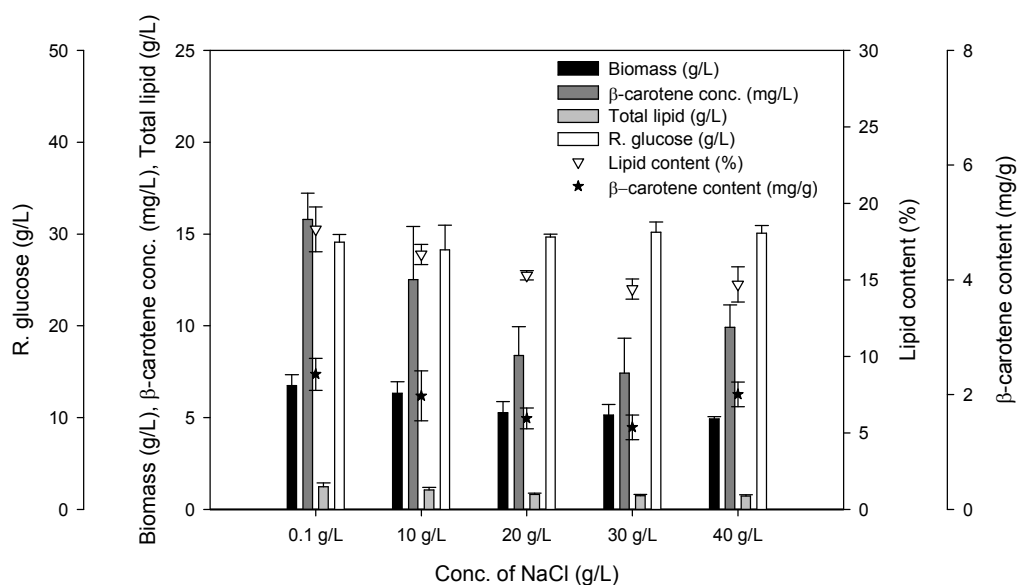


圖 4-2 改變鹽度(0.1、10、20、30、40 g/L)培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-2 改變鹽度(0.1、10、20、30、40 g/L)培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長之實驗數據

NaCl conc. (g/L)	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	β - carotene content (mg/g)	β - carotene conc. (mg/L)
0.1	2.04 \pm 0.05	6.73 \pm 0.61	18.30 \pm 1.47	1.24 \pm 0.20	2.36 \pm 0.28	15.79 \pm 1.44
10	1.94 \pm 0.06	6.33 \pm 0.61	16.7 \pm 0.67	1.06 \pm 0.14	1.98 \pm 0.44	12.51 \pm 2.89
20	1.97 \pm 0.01	5.27 \pm 0.61	15.3 \pm 0.30	0.81 \pm 0.09	1.59 \pm 0.18	8.38 \pm 1.57
30	1.98 \pm 0.01	5.13 \pm 0.58	14.4 \pm 0.66	0.74 \pm 0.09	1.43 \pm 0.22	7.42 \pm 1.89
40	1.98 \pm 0.02	4.93 \pm 0.12	14.7 \pm 1.15	0.72 \pm 0.07	2.00 \pm 0.22	9.91 \pm 1.22

4.1.3 培養基 C/N 比之影響

本實驗探討改變碳源(glucose)及氮源($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)比例對 *Rhodotorula glutinis* 生長影響，文獻(Braunwald, Schwemmlin et al. 2013)指出 C/N 提高能提升油脂形成及 β -胡蘿蔔素的合成，故本實驗分成兩個部分：第一部分是固定氮源濃度($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/l)，改變碳源濃度(glucose, 30、60、120 g/l)，C/N 依序為 18.4、36.8、73.7，實驗結果如圖 4-3 顯示出隨著碳源濃度提升，油脂含量有明顯的提升，而 β -胡蘿蔔素濃度也隨之提升，其中 β -胡蘿蔔素濃度最高可達到 15.16 mg/L，但對於 *R. glutinis* 濃度並沒有太大的改變，由此推測 *R. glutinis* 在指數生長期後及 pH 大幅下降後便不再繼續利用碳源生長，以及在一次給予過多碳源濃度下，菌體反而將過多的碳源進行油脂和 β -胡蘿蔔素的合成。

第二部分將碳源濃度固定(glucose, 60g/l)，改變氮源濃度($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1、2、4 g/l)，實驗結果如圖 4-4 顯示出 *R. glutinis* 的濃度與油脂合成沒有太大的影響，推測所添加的為無機氮源，不僅容易離子化，微生物雖能快速吸收，相對地生物代謝快，導致 pH 值快速下降，讓整體環境不利於生長；然而在 β -胡蘿蔔素的含量上有些許的變化，當氮源濃度為控制組的一半時， β -胡蘿蔔素的含量能多 0.6 mg/g，其含量高達 2.65 mg/g，由於 acetyl- coA 是 β -胡蘿蔔素和油脂生成上主要的建構環節，且會在一級、二級代謝進行轉換，並且有文獻(Luo, Niu et al. 2013)中指出在 pH 較低的環境下有利於 β -胡蘿蔔素的合成，結果顯示 β -胡蘿蔔素的合成較明顯受到氮源限制及 pH 的影響。

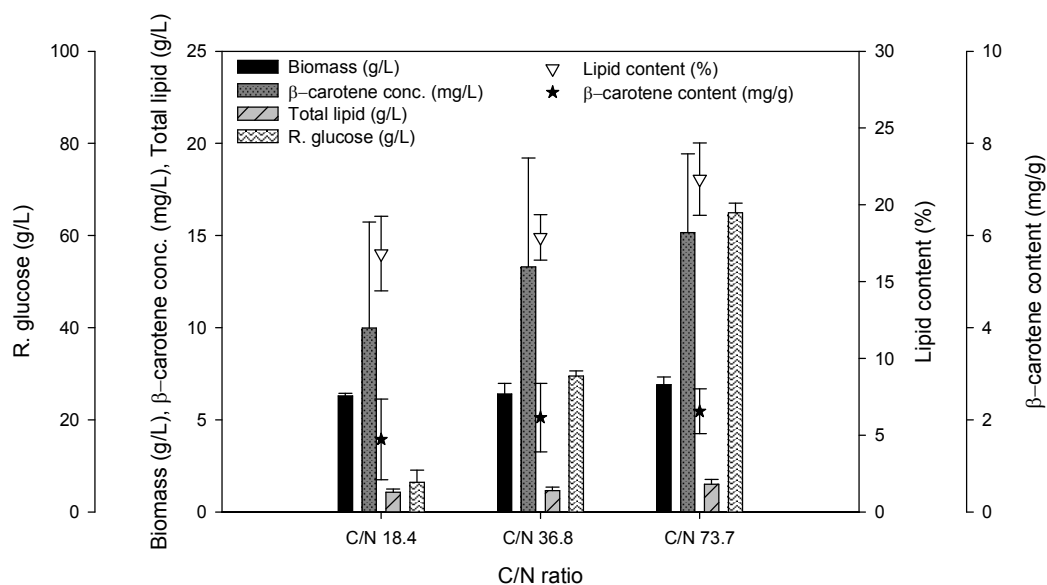


圖 4-3 固定氮源濃度、改變碳源濃度，培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長影響 (氮源- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L；碳源- 葡萄糖 30 g/l、60 g/l、120 g/l)

表 4-3 固定氮源濃度、改變碳源濃度，培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長影響之實驗數據 (氮源- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L；碳源- 葡萄糖 30 g/l、60 g/l、120 g/l)

C/N ratio (C conc.-g/L/ N conc.-g/L)	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	β- carotene content (mg/g)	β- carotene conc. (mg/L)
18.4 (30/ 2)	1.98 ±0.05	6.3 ±0.14	16.82 ±2.43	1.06 ±0.18	1.57 ±0.88	9.98 ±5.75
36.8 (60/ 2)	2.02 ±0.03	6.4 ±0.57	17.88 ±1.48	1.15 ±0.20	2.05 ±0.74	13.31 ±5.89
73.7(120/ 2)	1.97 ±0.08	6.9 ±0.42	21.67 ±2.36	1.51 ±0.25	2.18 ±0.49	15.16 ±4.28

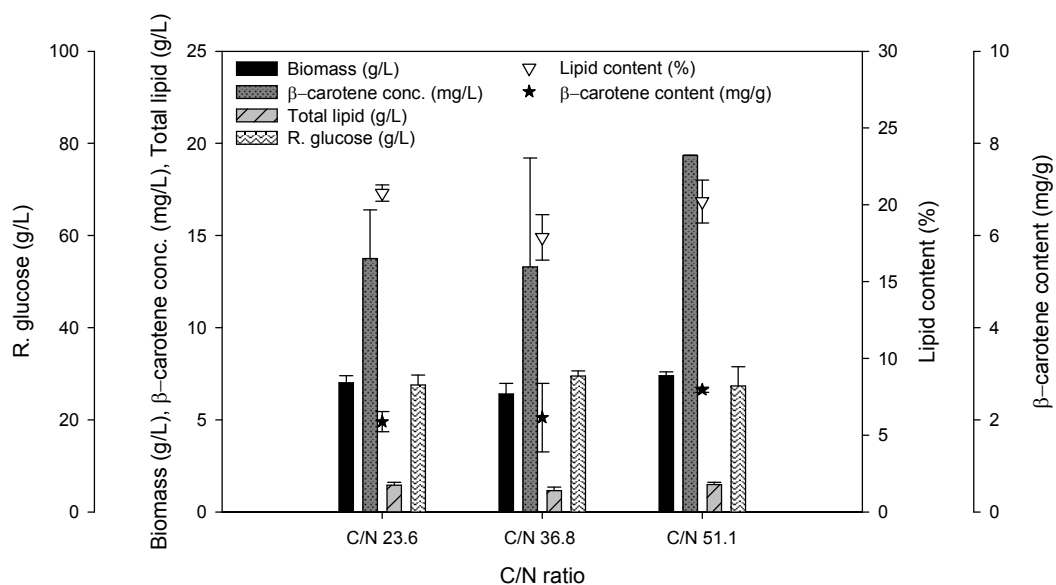


圖 4-4 固定碳源濃度、改變氮源濃度，培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長影響 (碳源-葡萄糖 60 g/L；氮源- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g/l、2 g/l、1 g/l)

表 4-4 固定碳源濃度、改變氮源濃度，培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長影響之實驗數據 (碳源-葡萄糖 60 g/L；氮源- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g/l、2 g/l、1 g/l)

C/N ratio (C conc.-g/L/ N conc.-g/L)	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	β- carotene content (mg/g)	β- carotene conc. (mg/L)
23.6(60/ 4)	2.04 ±0.01	7.0 ±0.4	20.77 ±0.53	1.46 ±0.15	1.96 ±0.22	13.76 ±2.64
36.8(60/ 2)	2.02 ±0.03	6.4 ±0.57	17.88 ±1.48	1.15 ±0.20	2.05 ±0.74	13.31 ±5.90
51.1(60/ 1)	2.2 ±0.01	7.4 ±0.20	20.22 ±1.39	1.48 ±0.13	2.65 ±0.05	19.35 ±0.02

4.1.4 照光之影響

文獻(Sakai, Nakanishi et al. 2001)指出 *R. glutinis* 在受到弱白光照射下將會生成 β -胡蘿蔔素以防止由光造成輻射的氧化損傷，以及微生物可以透過照光的方式，改變其體內蛋白質合成的途徑，進而間接地影響到菌體的生長與代謝產物的生成，因此，本次實驗將探討照光($38.18\mu\text{mol/s/m}^2$)與不照光(暗室)對於 *R. glutinis* 生長、累積油脂及 β -胡蘿蔔素生產之影響；實驗結果如圖 4-5，結果顯示在照光下能將 *R. glutinis* 濃度可從 4.5 g/l 提升至 6.7 g/l，照光能明顯地提升菌體濃度，在油脂含量的部分，不照光高於照光 6.37%，但受到 *R. glutinis* 濃度的影響，使得最終總油脂量還是以照光組較高並達到 1.52 g/l；經由照光後 β -胡蘿蔔素的含量能提升 9.91%，與文獻結果相符，並且隨著 *R. glutinis* 濃度的影響，使得 β -胡蘿蔔素濃度從 10.13 mg/l 提高至 16.84 mg/l。

結論，照光下，能提升菌體濃度以及 β -胡蘿蔔素含量，油脂累積下降；反之，不照光下，菌體濃度與 β -胡蘿蔔素含量較低，但對於油脂累積能有所提升，由於適度的照光下能增加培養基內活性氧的產生(孫證雄, 2011)，推測 *R. glutinis* 將剩餘的碳源進而生產 β -胡蘿蔔素以防止活性氧的破壞，導致油脂含量會因照光而有所下降。

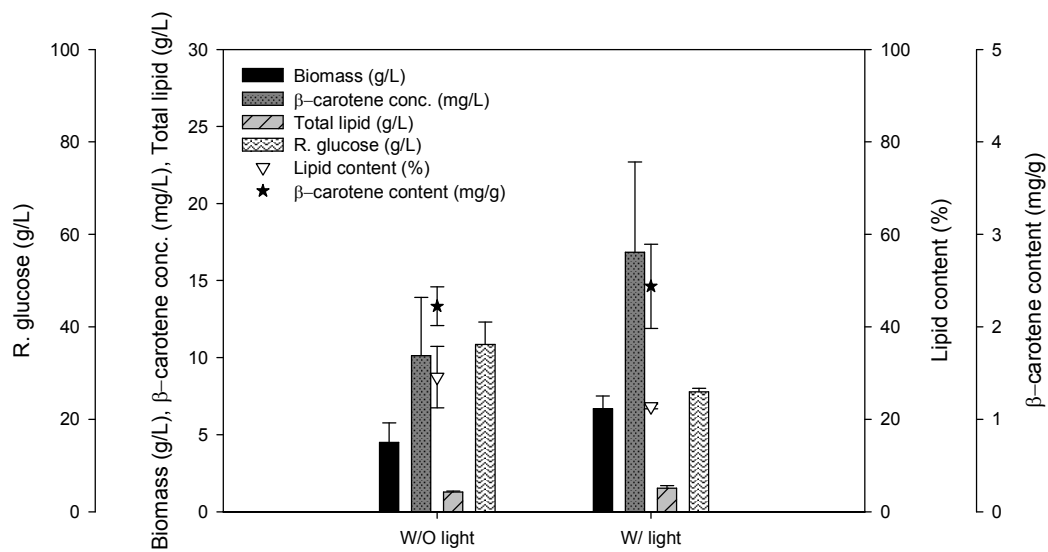


圖 4-5 不照光與照光，培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長影響 (光強度: $38.18 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)

表 4-5 不照光與照光，培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長影響之實驗數據 (光強度: $38.18 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)

Effect of irradiation (hour, $\mu\text{mol}/\text{s}/\text{m}^2$)	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	β- carotene content (mg/g)	β- carotene conc. (mg/L)
W/O light (48,0)	2.69 ± 0.01	4.50 ± 1.27	29.12 ± 6.63	1.27 ± 0.07	2.22 ± 0.21	10.13 ± 3.77
W/ light (48, 38.18)	1.90 ± 0.01	6.70 ± 0.83	22.75 ± 0.50	1.52 ± 0.17	2.44 ± 0.46	16.84 ± 5.86

4.1.5 添加過氧化氫(H₂O₂)之影響

文獻(Yan, Liang et al. 2011)中指出添加活性氧物種(reactive oxygen species, ROS)所造成的氧化壓力，以及細胞中的抗氧化酵素的活性皆會影響 β-胡蘿蔔素的生長，而過氧化氫屬於活性氧物種之一，藉由氧化所造成的壓力誘導 *R. glutinis* 生產 β-胡蘿蔔素以防止細胞被自由基破壞，由於 β-胡蘿蔔素對於 *R. glutinis* 是二級代謝產物，因此，本實驗分成兩部分探討，第一部分在培養第 0 小時添加 0.5 mM 的過氧化氫，探討初期添加過氧化氫對於 *R. glutinis* 之影響性；第二部分在培養第 48 小時添加不同濃度的 H₂O₂ (0 mM、0.25 mM、0.5 mM、1 mM)，探討在菌體停滯生長期與產物生產之影響，並且分別在第 60 小時及第 72 小時取樣。

第一部分，0 小時添加過氧化氫之實驗結果如圖 4-6，有添加 H₂O₂ 的部分，結果發現 β-胡蘿蔔素的含量從 2.11 mg/g 提升至 2.64 mg/g，隨之提升 β-胡蘿蔔素的濃度從 13.72 mg/L 提升至 18.50 mg/L，然而對於油脂累積沒有太大的影響性。

第二部分，在第 60 小時取樣之實驗結果如圖 4-7，隨著 H₂O₂ 的濃度增加 *R. glutinis* 濃度有些許上升，而殘糖量隨之遞減，推測是在第 48 小時，細胞還會生長，而細胞內具有過氧化氫酶(catalase)為了減緩細胞被氧化，會先將 H₂O₂ 分解成水及氧氣，此時氧氣提升使培養基內的溶氧量提高，造成 *R. glutinis* 濃度上升；而在累積油脂部分，H₂O₂ 的濃度從 0 mM 到 0.5 mM，其油脂含量皆隨之下降，但在 1 mM 的濃度添加下，油脂含量卻能達到 23.46%，推測在 H₂O₂ 低濃度下會提升生產 β 胡蘿蔔素防止細胞被氧化，造成 β-胡蘿蔔素隨之增加而降低油脂累積，但在 1 mM 的 H₂O₂ 濃度促使油脂及 β-胡蘿蔔素都提升的部分不清楚。

在第 72 小時取樣之時間結果如圖 4-8，隨著 H₂O₂ 的濃度增加 *R. glutinis* 濃度有些許上升，但在 H₂O₂ 濃度為 1 mM，*R. glutinis* 濃度卻停滯生長，甚至降低至 9.27 g/l，推 1 mM 的 H₂O₂ 濃度可能高於細胞所能負荷的，除此之外，也有可

能是細胞內的過氧化氫酶無法及時分解濃度較高的 H_2O_2 ，導致 *R. glutinis* 濃度下降；在產物的生產部分， H_2O_2 的濃度從 0 mM 至 0.5 mM，能明顯發現 β -胡蘿蔔素含量隨之增加，而油脂部分隨之微量下降，在 H_2O_2 的濃度為 1 mM 時，推測為了防止細胞被破壞，而過氧化氫酶並沒有即時分解 H_2O_2 ，便利用 β -胡蘿蔔素進行抗氧化，使得 β -胡蘿蔔素含量下降。結論，適量地添加 H_2O_2 對於 *R. glutinis* 濃度、 β -胡蘿蔔素有所影響，且與細胞內的過氧化氫酶的活性有很大的關係。

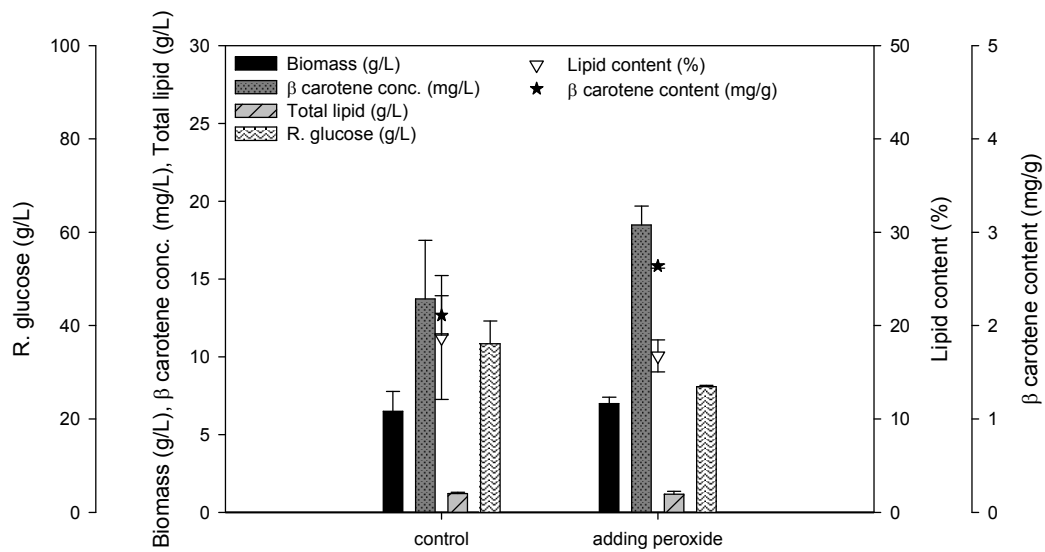


圖 4-6 探討於培養時間 0 小時時添加 0.5 mM 的過氧化氫對於 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-6 探討於培養時間 0 小時時添加 0.5 mM 的過氧化氫對於 *R. glutinis* 生長之影響

Concentration of peroxide	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	β- carotene content (mg/g)	β- carotene conc. (mg/L)
0 mM	2.01 ±0.01	6.50 ±1.30	18.74 ±1.52	1.22 ±0.07	2.11 ±0.21	13.72 ±3.77
0.5 mM	2.25 ±0.03	7.00 ±0.40	16.77 ±1.69	1.18 ±0.18	2.64 ±0.02	18.5 ±1.20

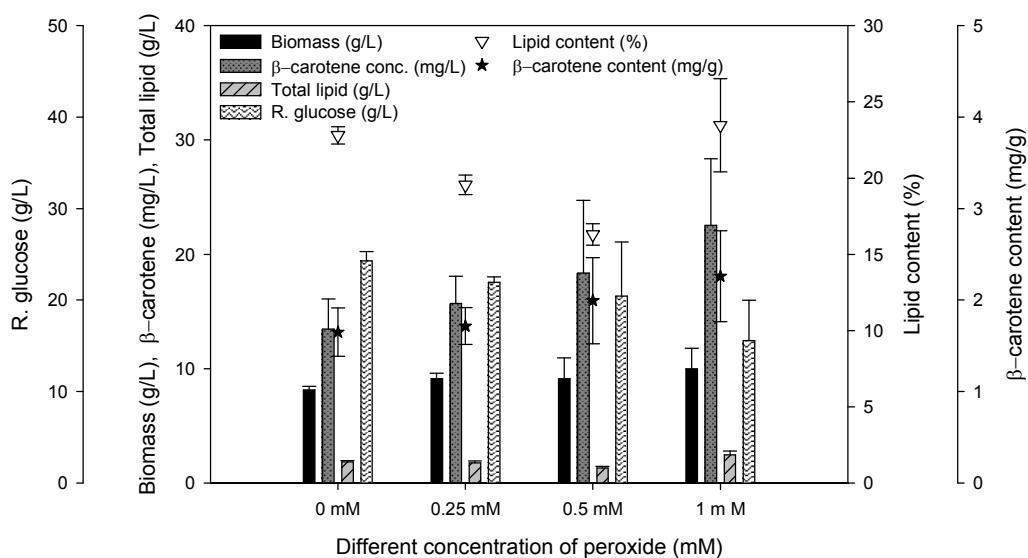


圖 4-7 探討添加不同濃度的過氧化氫對於 *R. glutinis* 生長之影響 (菌體培養至 48 小時時添加 H₂O₂，第 60 小時取樣)

表 4-7 探討添加不同濃度的過氧化氫對於 *R. glutinis* 生長之影響 (菌體培養至 48 小時時添加 H₂O₂，第 60 小時取樣)

Concentration of peroxide	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	β-carotene content (mg/g)	β-carotene conc. (mg/L)
0 mM	2.04 ± 0.02	8.13 ± 0.31	22.80 ± 0.56	1.86 ± 0.10	1.65 ± 0.27	13.47 ± 2.63
0.25 mM	1.95 ± 0.03	9.13 ± 0.46	19.55 ± 0.64	1.76 ± 0.17	1.71 ± 0.20	15.69 ± 2.40
0.5 mM	1.98 ± 0.01	9.13 ± 1.81	16.30 ± 0.71	1.32 ± 0.13	1.99 ± 0.47	18.36 ± 6.37
1 mM	1.95 ± 0.01	10.0 ± 1.78	23.46 ± 0.85	2.47 ± 0.33	2.56 ± 0.50	22.52 ± 5.81

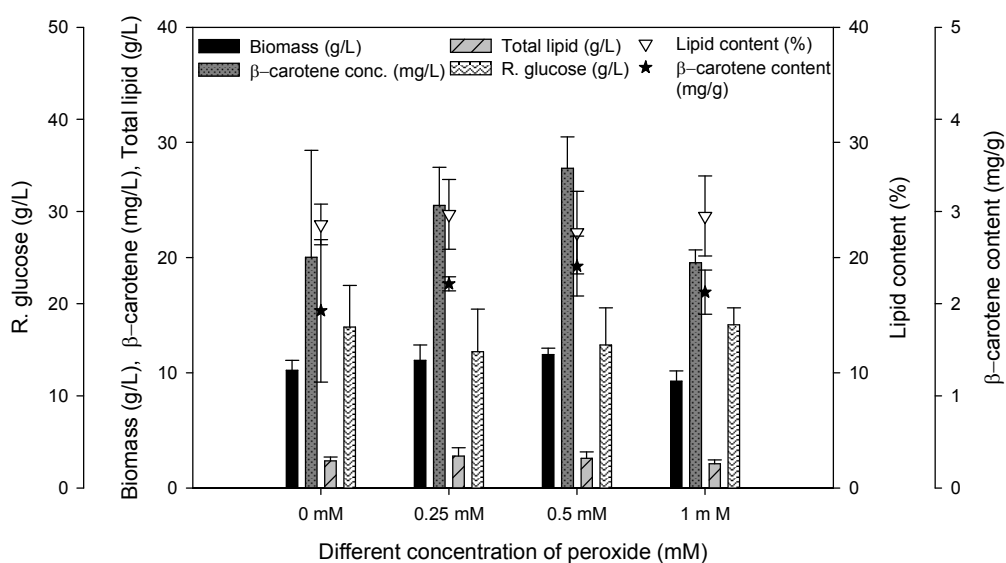


圖 4-8 探討添加不同濃度的過氧化氫對於 *R. glutinis* 生長之影響 (菌體培養至 48 小時時添加 H_2O_2 ，第 72 小時取樣)

表 4-8 探討添加不同濃度的過氧化氫對於 *R. glutinis* 生長之影響 (菌體培養至 48 小時時添加 H_2O_2 ，第 72 小時取樣)

Concentration of peroxide	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	β- carotene content (mg/g)	β- carotene conc. (mg/L)
0 mM	1.89 ± 0.06	10.20 ± 0.87	22.87 ± 1.76	2.34 ± 0.35	1.92 ± 0.77	20.04 ± 9.27
0.25 mM	1.92 ± 0.02	11.07 ± 1.33	23.75 ± 3.04	2.76 ± 0.72	2.22 ± 0.08	24.54 ± 3.31
0.5 mM	1.91 ± 0.04	11.57 ± 0.57	22.17 ± 3.59	2.57 ± 0.55	2.41 ± 0.32	27.75 ± 2.73
1 mM	1.92 ± 0.03	9.27 ± 0.90	21.40 ± 2.12	2.08 ± 0.35	2.12 ± 0.24	19.56 ± 1.10

4.1.6 添加乙醇之影響

由於 HMG-CoA 還原酶是合成異戊二烯的重要酵素，因此，為了能有效提升 β -胡蘿蔔素含量，利用低濃度的乙醇作為添加劑，提升 HMG-CoA 的活性，誘導 β -胡蘿蔔素產生。本實驗改變乙醇濃度 (0 g/L、2 g/L、4 g/L、10 g/L) 探討對於 *Rhodotorula glutinis* 的生長及 β -胡蘿蔔素含量影響；由圖 4-9 顯示出 *R. glutinis* 濃度與 β -胡蘿蔔素的含量上無太大影響，與文獻針對 *Phaffia rhodozyma* 添加 0.2% 乙醇的測試(Gu, An et al. 1997)結果不相符，在添加乙醇下，無法明顯提升 β -胡蘿蔔素含量，推測 β -胡蘿蔔素為二次代謝產物，故應於菌體停滯生長期時添加。

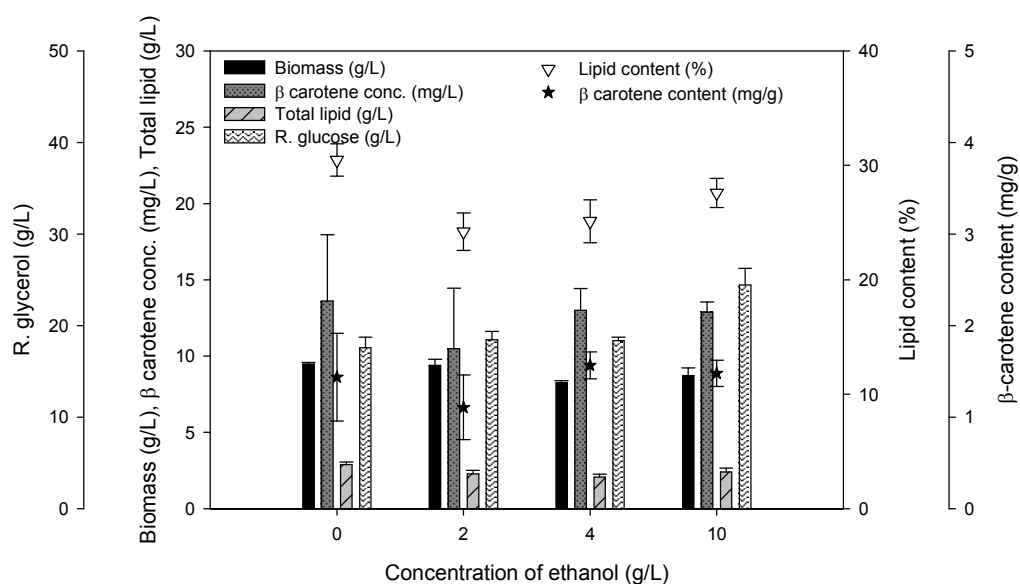


圖 4-9 改變添加乙醇濃度，培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長影響

表 4-9 改變添加乙醇濃度，培養 48 hr，並探討對 *R. glutinis* 生長影響之實驗數據

EtOH conc. (g/L)	Final pH	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	β - carotene content (mg/g)	β - carotene conc. (mg/L)
0	1.82 \pm 0.02	9.46 \pm 0.12	30.47 \pm 1.42	2.88 \pm 0.17	1.43 \pm 0.48	13.62 \pm 4.33
2	1.82 \pm 0.04	9.40 \pm 0.40	24.21 \pm 1.64	2.28 \pm 0.23	1.11 \pm 0.35	10.50 \pm 3.95
4	1.81 \pm 0.02	8.27 \pm 0.12	25.12 \pm 1.87	2.08 \pm 0.17	1.57 \pm 0.15	13.00 \pm 1.44
10	1.83 \pm 0.03	8.73 \pm 0.50	27.60 \pm 1.27	2.41 \pm 0.25	1.48 \pm 0.14	12.87 \pm 0.68

4.1.7 改變環境因素之綜合探討

綜合改變環境因素之討論，結果如表 4-10 所示，並且分別對於菌體濃度、油脂含量以及 β -胡蘿蔔素含量影響性較大者進行探討。

在菌體濃度方面，改變碳源濃度，C/N73.7(glucose 120 g/L)相較於 C/N36.8 (控制組，glucose 60 g/L)提升 7.8 %的 *R. glutinis* 濃度；改變氮源濃度，C/N 23.6((NH₄)₂SO₄ 4 g/L)相較於 C/N 36.8(control, (NH₄)₂SO₄ 2 g/L)可提升 9.4 %*R. glutinis* 濃度；在培養初期添加 0.5 mM 過氧化氫可提升 7.7 %菌體濃度；以光照組影響菌體生長最大，經由光照可提升 48.8 %之菌體濃度，

油脂含量部分，改變碳源濃度，C/N73.7(glucose 120 g/L)相較於 C/N36.8 (控制組，glucose 60 g/L)可提升 21.2 %；在改變培養基介質影響油脂累積最大，以海洋深層水且不添加有機氮源可提升油脂累積含量 78.51 %，然而在不添加有機氮的條件下不利於菌體生長，導致最終總油脂量低，因此此培養條件不利於生產油脂。

β -胡蘿蔔素含量上，改變碳源濃度，C/N 73.7(glucose 120 g/L)可有效提升 6.34 %；而添加過氧化氫，其可提升 β -胡蘿蔔素含量 25.21 %；在照光下可提升 9.91 %；最具有影響性的改變是改變氮源濃度，C/N 51.1 ((NH₄)₂SO₄ 1 g/L)的條件下可提升 29.26 %。

表 4-10 海洋深層水、鹽度、C/N 比、照光、添加過氧化氫、添加乙醇之 *R. glutinis* 濃度、油脂與 β -胡蘿蔔素

Condition	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Total lipid (g/L)	β - carotene content (mg/g)	β - carotene conc. (mg/L)
RO water + YE	4.5 \pm 1.27	29.12 \pm 6.63	1.27 \pm 0.07	2.22 \pm 0.21	10.13 \pm 3.77
Sea water + YE	5.0 \pm 1.06	24.71 \pm 2.77	1.24 \pm 0.35	1.53 \pm 0.59	7.25 \pm 1.35
Sea water	2.4 \pm 0.92	44.11 \pm 3.27	0.83 \pm 0.13	1.32 \pm 0.36	2.99 \pm 0.68
NaCl 0.1 g/L	6.73 \pm 0.61	18.30 \pm 1.47	1.24 \pm 0.20	2.36 \pm 0.28	15.79 \pm 1.44
NaCl 10 g/L	6.33 \pm 0.61	16.7 \pm 0.67	1.06 \pm 0.14	1.98 \pm 0.44	12.51 \pm 2.89
NaCl 20 g/L	5.27 \pm 0.61	15.3 \pm 0.30	0.81 \pm 0.09	1.59 \pm 0.18	8.38 \pm 1.57
NaCl 30 g/L	5.13 \pm 0.58	14.4 \pm 0.66	0.74 \pm 0.09	1.43 \pm 0.22	7.42 \pm 1.89
NaCl 40 g/L	4.93 \pm 0.12	14.7 \pm 1.15	0.72 \pm 0.07	2.00 \pm 0.22	9.91 \pm 1.22
C/N 18.4	6.3 \pm 0.14	16.82 \pm 2.43	1.06 \pm 0.18	1.57 \pm 0.88	9.98 \pm 5.75
C/N 36.8	6.4 \pm 0.57	17.88 \pm 1.48	1.15 \pm 0.20	2.05 \pm 0.74	13.31 \pm 5.89
C/N 73.7	6.9 \pm 0.42	21.67 \pm 2.36	1.51 \pm 0.25	2.18 \pm 0.49	15.16 \pm 4.28
C/N 23.6	7.0 \pm 0.4	20.77 \pm 0.53	1.46 \pm 0.15	1.96 \pm 0.22	13.76 \pm 2.64
C/N 36.8	6.4 \pm 0.57	17.88 \pm 1.48	1.15 \pm 0.20	2.05 \pm 0.74	13.31 \pm 5.90
C/N 51.1	7.4 \pm 0.20	20.22 \pm 1.39	1.48 \pm 0.13	2.65 \pm 0.05	19.35 \pm 0.02
W/O light	4.5 \pm 1.27	29.12 \pm 6.63	1.27 \pm 0.07	2.22 \pm 0.21	10.13 \pm 3.77
W/ light (38.18)	6.7 \pm 0.83	22.75 \pm 0.50	1.52 \pm 0.17	2.44 \pm 0.46	16.84 \pm 5.86
H ₂ O ₂ 0 mM	6.5 \pm 1.3	18.74 \pm 1.52	1.22 \pm 0.07	2.11 \pm 0.21	13.72 \pm 3.77
H ₂ O ₂ 0.5 mM	7.0 \pm 0.4	16.77 \pm 1.69	1.18 \pm 0.18	2.64 \pm 0.02	18.5 \pm 1.20
EtOH 0 %	9.46 \pm 0.12	30.47 \pm 1.42	2.88 \pm 0.17	1.43 \pm 0.48	13.62 \pm 4.33
EtOH 0.2 %	9.40 \pm 0.40	24.21 \pm 1.64	2.28 \pm 0.23	1.11 \pm 0.35	10.50 \pm 3.95
EtOH 0.4 %	8.27 \pm 0.12	25.12 \pm 1.87	2.08 \pm 0.17	1.57 \pm 0.15	13.00 \pm 1.44
EtOH 1 %	8.73 \pm 0.50	27.60 \pm 1.27	2.41 \pm 0.25	1.48 \pm 0.14	12.87 \pm 0.68

4.2 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，本實驗利用 5 L 氣舉式發酵槽進行 *R. glutinis* 放大培養，並改變發酵策略，主要提升菌體生長速率，進而提升油脂與 β -胡蘿蔔素生產速率，其中探討以不同的方式來提升發酵槽內的溶氧量，並分成兩個部分：(1) 改變通氣量、(2) 改變槽體壓力。

4.2.1 通氣量之影響

由於 *Rhodotorula glutinis* 屬於好氧酵母菌，前人的研究中發現利用 5 L 攪拌式發酵槽培養 *R. glutinis* 並改變溶氧量，分別控制在 $60\pm 10\%$ 與 $25\pm 10\%$ ，結果顯示在高溶氧下菌體濃度較高，但油脂累積卻較低(張智勇, 2011)，除此之外，為了要降低在高速攪拌下所產生的剪切力對菌體造成的傷害，故本實驗利用 5 L 氣舉式發酵槽培養 *R. glutinis* 並改變通氣量(1 vvm、1.5 vvm、2 vvm、2.5 vvm)探討對於 *R. glutinis* 的生長影響。

實驗結果如圖 4-10、4-11、4-12、4-13 所示，在通氣量為 1 vvm、1.5 vvm、2 vvm、2.5 vvm 時，最大菌體濃度分別為 16.6、18.0、25.4、23.4 g/L，菌體最大生長速率(=菌體濃度/發酵時間)分別為 0.12、0.31、0.38、0.46 g/L/h，結果顯示隨著通氣量提升與菌體濃度具有正相關，此外，以粗甘油起始濃度為 60 g/L 所培養的菌體濃度生長最大極限約為 24 g/L，所以能確定當菌體濃度達到碳源濃度的 2/5 時，*R. glutinis* 便不再生長。

最大油脂含量(=油脂重/菌體重)分別為 46.8、56.42、51.37、39.03 %，最大油脂生產速率(=生成油脂濃度/發酵時間)分別為 0.05、0.13、0.21、0.22 g/L/h，在油脂含量方面，顯示出在 2.5 vvm 通氣量下，所累積的油脂含量最低，其結果與前人所做的結論相符；最大 β -胡蘿蔔素含量=((HPLC 分析濃度 \times 分析體積)/分

析菌體重)為 0.36、2.04、1.06、1.05 mg/g，最大 β -胡蘿蔔素生產速率(=生成 β -胡蘿蔔素濃度/發酵時間)分別為 0.08、0.45、0.69、1.10 mg/L/h，而 β -胡蘿蔔素含量隨著通氣量提升而提升，但在 2.5 vvm 的條件下卻沒有如期提升，推測是因發酵槽的高度受限，使氧氣滯留率不高，導致在高通氣量下無法得到預期的效果，結論，隨著通氣量提升皆能正向影響 *R. glutinis* 生長、油脂生產速率及 β -胡蘿蔔素生產速率，但不利於累積油脂。

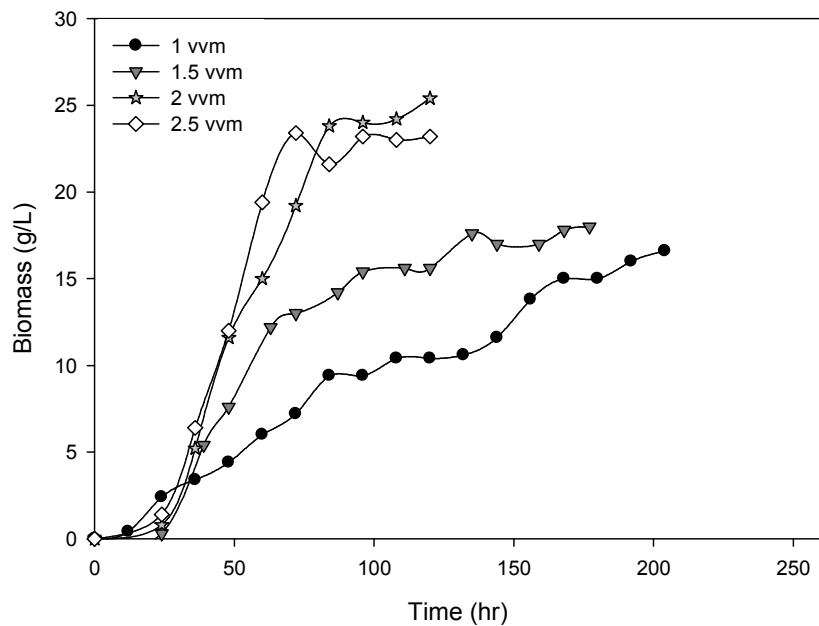


圖 4-10 改變通氣量(1 vvm、1.5 vvm、2 vvm、2.5 vvm)探討對 *R. glutinis* 濃度之影響

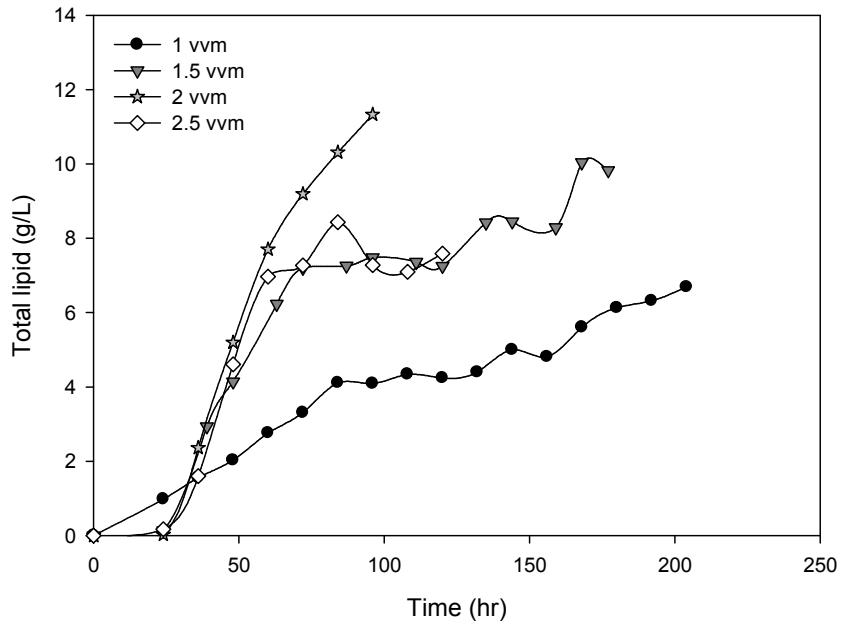


圖 4-11 改變通氣量(1 vvm、1.5 vvm、2 vvm、2.5 vvm)探討對 *R. glutinis* 累積油脂之影響

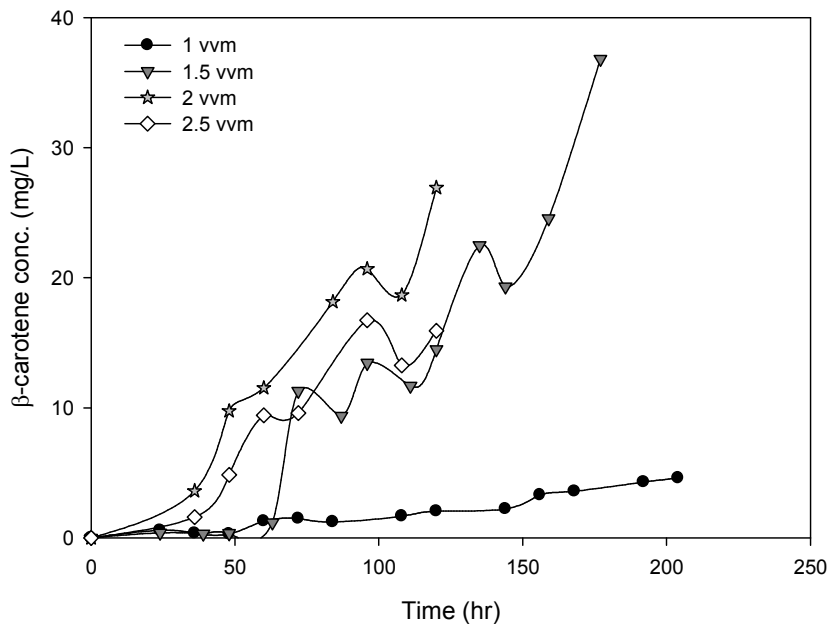


圖 4-12 改變通氣量(1 vvm、1.5 vvm、2 vvm、2.5 vvm)探討對 *R. glutinis* 生產β-胡蘿蔔素之影響

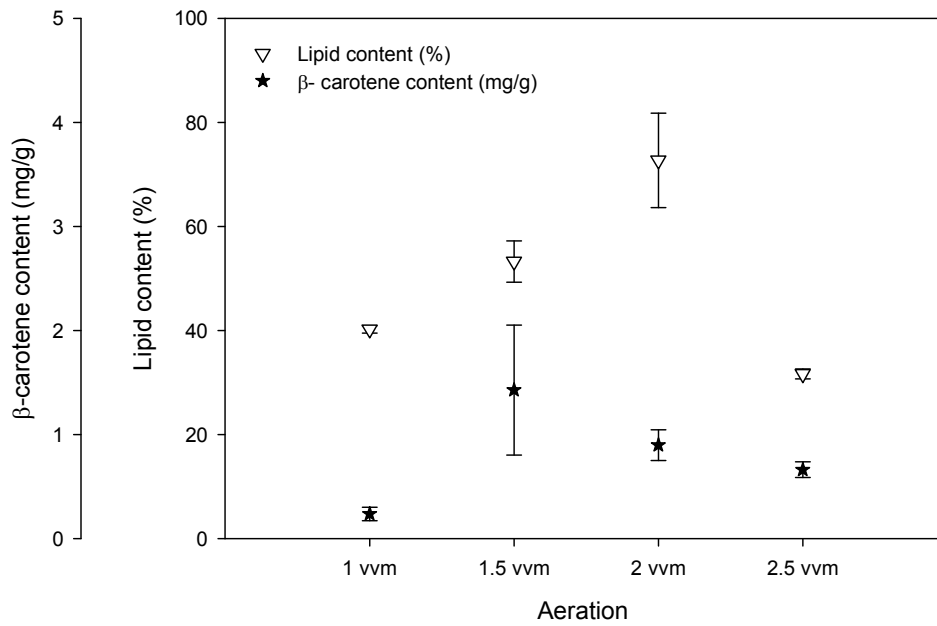


圖 4-13 改變通氣量(1 vvm、1.5 vvm、2 vvm、2.5 vvm)探討對 *R. glutinis* 累積油脂含量及 β -胡蘿蔔素含量之影響

表 4-11 改變通氣量(1 vvm、1.5 vvm、2 vvm、2.5 vvm)批次發酵策略之動力參數

Aeration	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Max. lipid productivity (g/L/h)	Max. β -carotene content (mg/g)	Max. β -carotene productivity (mg/L/h)
1 vvm	16.6	0.12	46.80	0.05	0.36	0.08
1.5 vvm	18.0	0.31	56.42	0.13	2.04	0.45
2 vvm	25.4	0.38	51.37	0.21	1.06	0.69
2.5 vvm	23.4	0.46	39.03	0.22	1.05	1.10



圖 4-14 5 L 氣舉式發酵槽，*R. glutinis* 在通氣量 1.5 vvm 下 240 hr 之變化情形

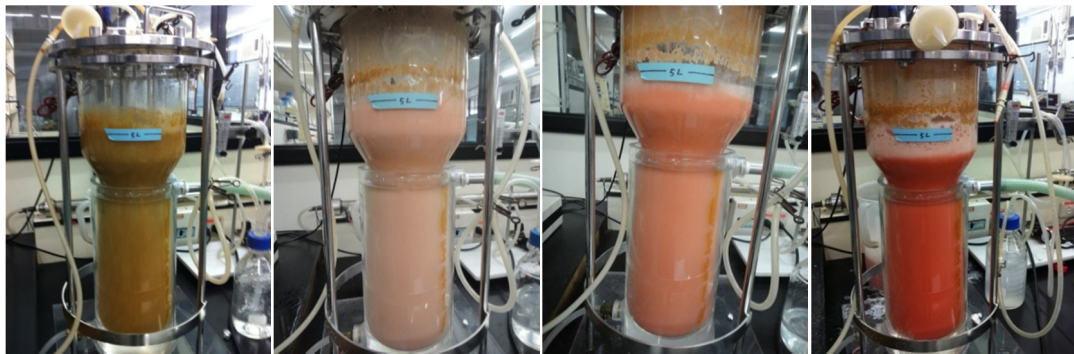


圖 4-15 5 L 氣舉式發酵槽，*R. glutinis* 在通氣量 2 vvm 下 120 hr 之變化情形

4.2.2 壓力之影響

為了節省空壓機供應氣體所消耗的能源以及提升槽體溶氧量，本實驗固定通氣量 1.5 vvm，並在槽體排氣處設置閥，以閥的開合大小來控制槽體壓力。實驗結果如圖 4-16、4-17、4-18，結果顯示在壓力 0.2 atm 時可得最大菌體濃度 22.2 g/L，而在 0.5 atm 下菌體濃度卻下降至 17 g/L，顯示出壓力與菌體濃度及最大菌體生長速率並無直接關係，推測在 0.5 atm 下，其排氣量少，導致菌體生長到一定程度後，所排出的二氧化碳無法順利排到發酵槽外，導致槽體內的二氧化碳濃度高，而菌體生長狀態不佳且慢。

壓力從 0、0.2、0.5 atm 下，其最大油脂含量分別為 56.42、46.25、64.20%，最大油脂生成素率為 0.13、0.06、0.19 g/L/h，在 0.5 atm 下油脂含量及生成素率最佳，而在 0.2 atm 下其結果最差，反觀，最大 β -胡蘿蔔素含量為 2.04、2.13、1.59 mg/g，最大 β 胡蘿蔔素速率為 0.45、0.83、0.74 mg/L/h，在 0.2 atm 下 β -胡蘿蔔素的含量及生產速率為最佳，推測在壓力的不同下，其溶氧效果皆有所不同，導致 *R. glutinis* 的代謝路徑有所不同，結論，隨著壓力增加對菌體整體生長及代謝過程沒有正向關係，唯獨適當調整壓力控制方能提高其中一項產物的產量。

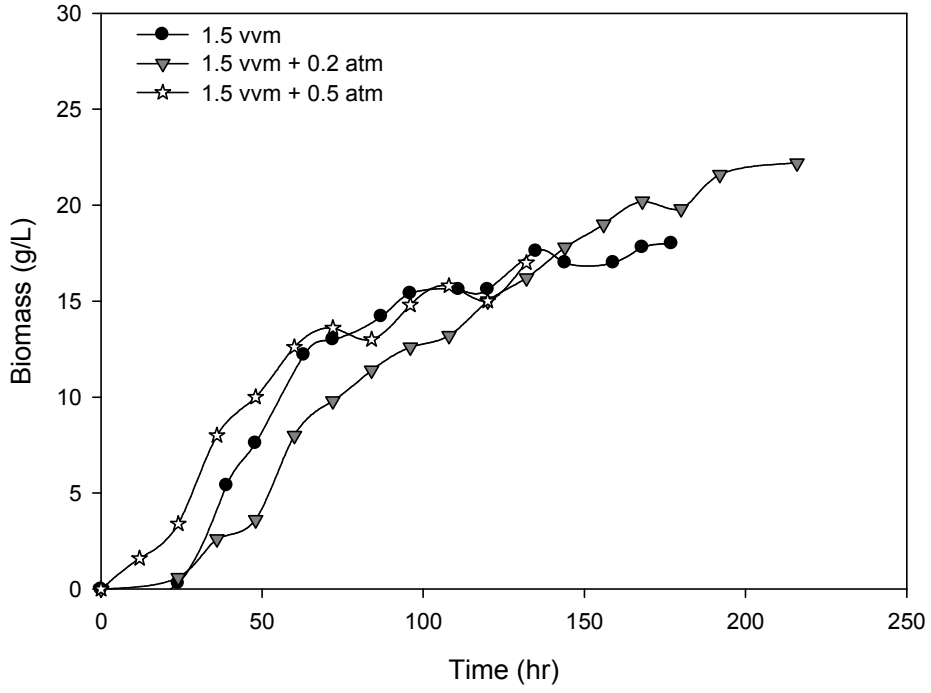


圖 4-16 固定通氣量 1.5 vvm，改變壓力(0 atm、0.2 atm、0.5 atm)探討對 *R. glutinis* 濃度之影響

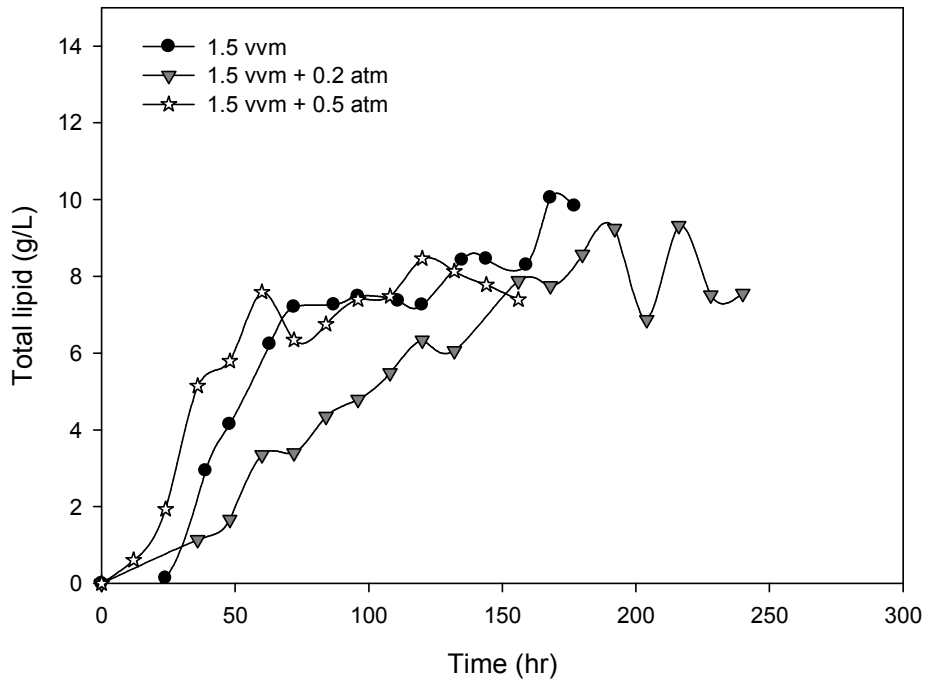


圖 4-17 固定通氣量 1.5 vvm，改變壓力(0 atm、0.2 atm、0.5 atm)探討對 *R. glutinis* 累積油脂之影響

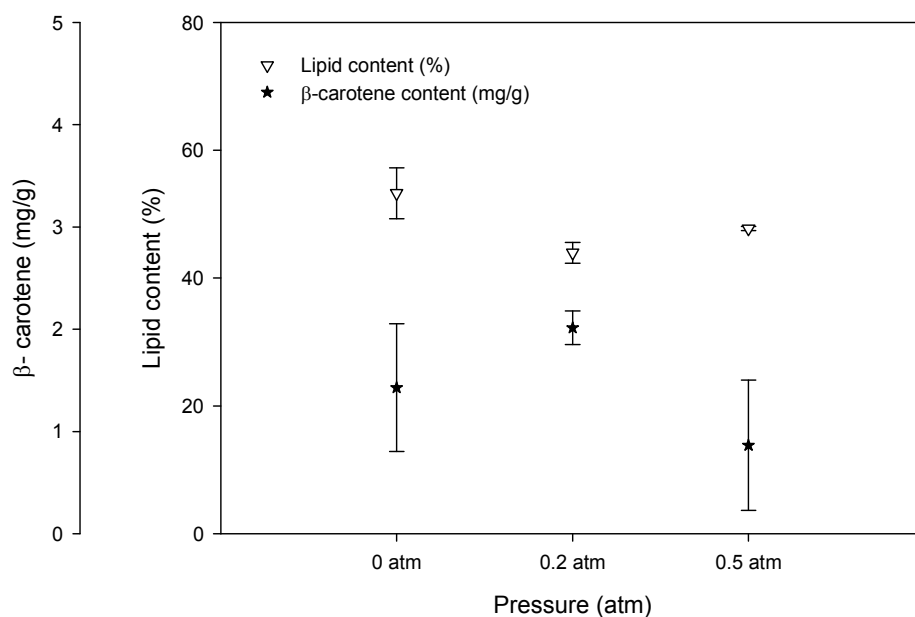


圖 4-18 固定通氣量 1.5 vvm，改變壓力(0 atm、0.2 atm、0.5 atm)探討對 *R. glutinis* 累積油脂含量及 β-胡蘿蔔素含量之影響

表 4-12 固定通氣量 1.5 vvm，改變槽體壓力(0 atm、0.2 atm、0.5 atm)批次發酵策略之動力參數

Pressure	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Max. lipid productivity (g/L/h)	Max. β-carotene content (mg/g)	Max. β-carotene productivity (mg/L/h)
0 atm	18.0	0.31	56.42	0.13	2.04	0.45
0.2 atm	22.2	0.21	46.25	0.06	2.13	0.83
0.5 atm	17.0	0.26	64.20	0.19	1.59	0.74

4.3 20 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序

4.3.1 通氣量之影響

本實驗利用 20 L 氣舉式發酵槽放大培養 *Rhodotorula glutinis* 並探討通氣量的影響，實驗結果如圖 4-19、4-20、4-21、4-22，菌體濃度方面，在 1.5 vvm 通氣量下達到最高菌體濃度 23.3 g/L，及最高生長速率 0.65 g/L/h，隨著通氣量的增加，菌體濃度及生長速率隨之提升；除此之外，在油脂累積及 β -胡蘿蔔素生成速率皆與通氣量成正向關係，結論，與 5 L 氣舉式發酵槽改變通氣量得到相同的實驗結果。

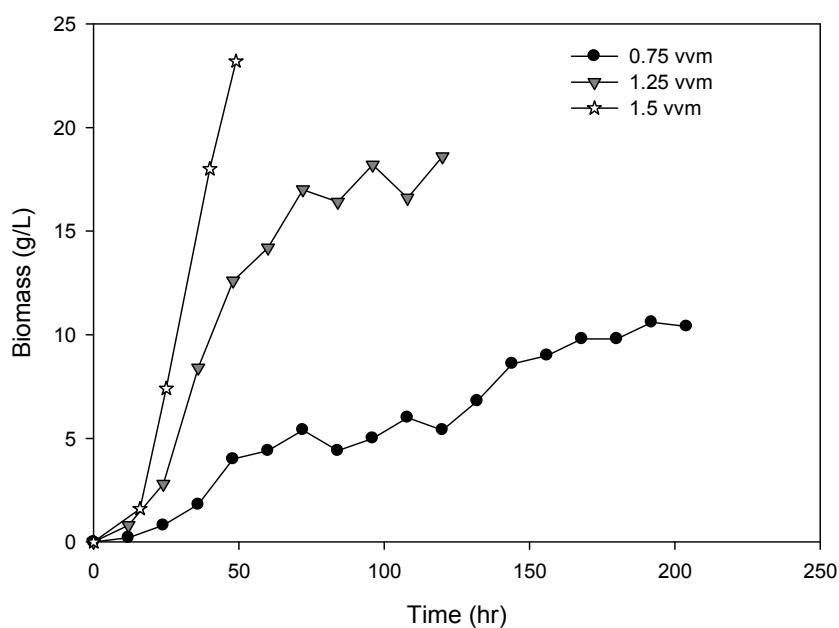


圖 4-19 改變通氣量(0.75 vvm、1.25 vvm、1.5 vvm)探討對 *R. glutinis* 濃度之影響

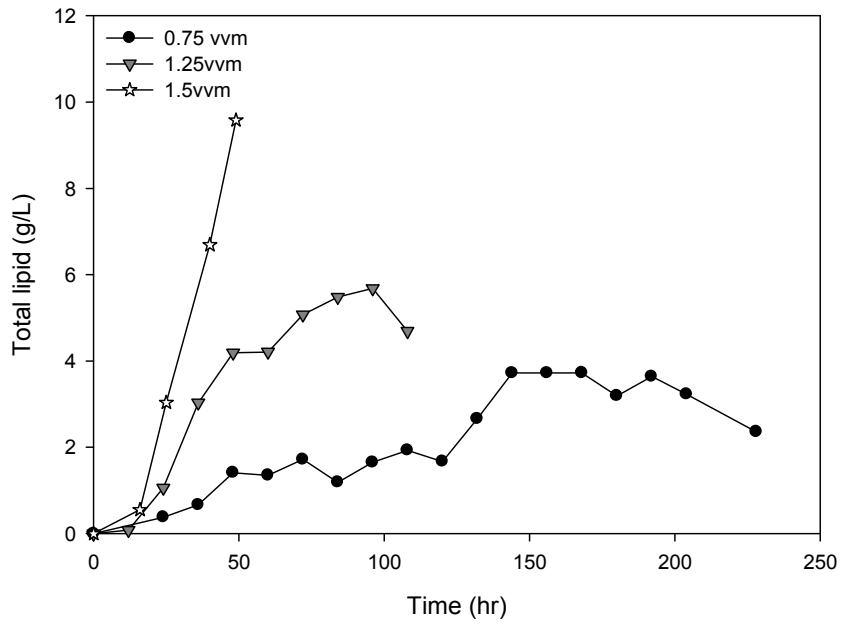


圖 4-20 改變通氣量(0.75 vvm、1.25 vvm、1.5 vvm)探討對 *R. glutinis* 油脂累積之影響

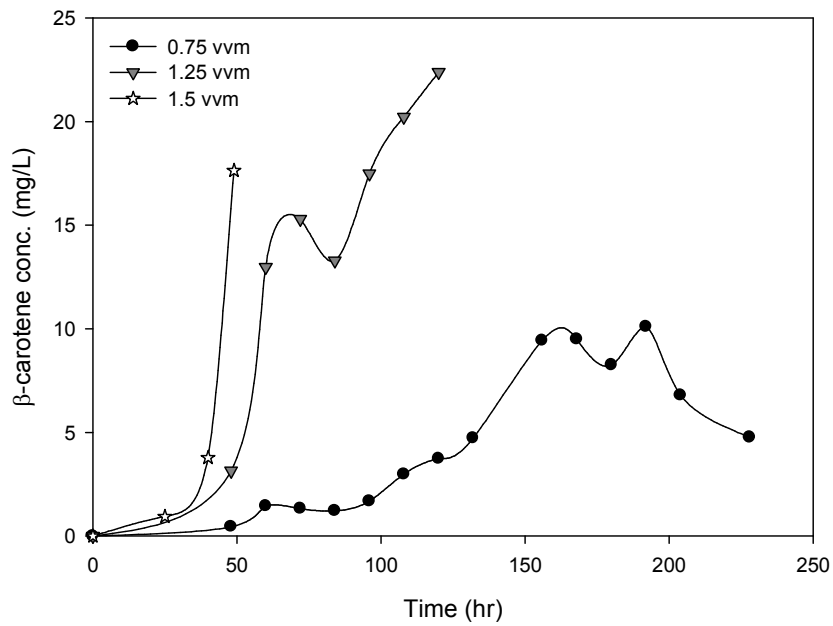


圖 4-21 改變通氣量(0.75 vvm、1.25 vvm、1.5 vvm)探討對 *R. glutinis* 濃度產 β -胡蘿蔔素之影響

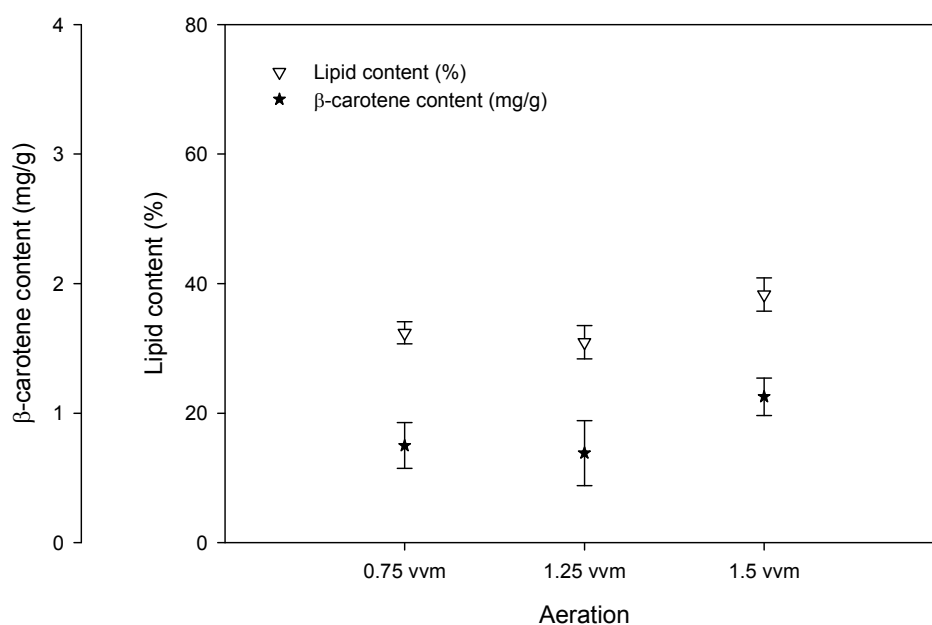


圖 4-22 改變通氣量(0.75 vvm、1.25 vvm、1.5 vvm)探討對 *R. glutinis* 累積油脂含量及 β-胡蘿蔔素含量之影響

表 4-13 改變通氣量(0.75 vvm、1.25 vvm、1.5 vvm)批次發酵策略之動力參數

Aeration	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Max. lipid productivity (g/L/h)	Max. β-carotene content (mg/g)	Max. β-carotene productivity (mg/L/h)
0.75 vvm	10.6	0.08	43.30	0.09	1.04	0.18
1.25 vvm	18.6	0.41	39.80	0.13	1.22	0.20
1.5 vvm	23.2	0.65	41.27	0.27	1.00	1.50

4.4 15 L 攪拌式發酵槽 批次發酵程序

本實驗利用 15 L 攪拌式發酵槽培養 *Rhodotorula glutinis*，藉此探討攪拌式發酵槽與氣舉式發酵槽對 *R. glutinis* 之影響。15 L 攪拌式發酵槽之策略為固定通氣量 1 vvm，溶氧量 $30 \pm 10\%$ ，5 L 氣舉式發酵槽固定相同通氣量，結果如圖 4-23、4-24、4-25，顯示 *R. glutinis* 生長速率分別為 0.51、0.12 g/L/h，最大油脂累積生成速率為 0.19、0.05 g/L/h，最大 β -胡蘿蔔素生成速率為 0.5、0.08 mg/L/h，結論，15 L 攪拌式發酵槽能利用攪拌葉片將槽體內的溶氧量迅速提高，所以對於好氧的 *R. glutinis* 能快速生長，故氣舉式發酵槽需改變發酵策略以提升 *R. glutinis* 生長速率及產物的產率。

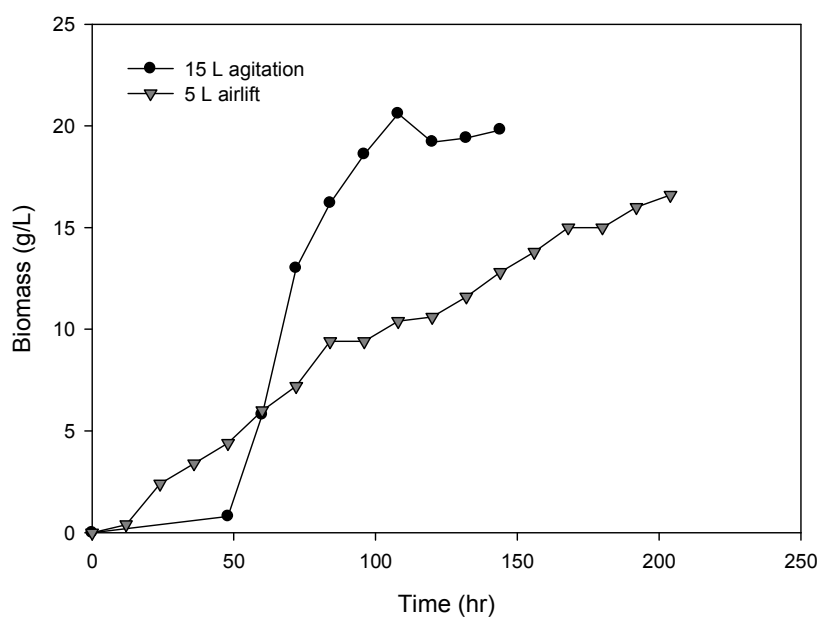


圖 4-23 改變生物反應器(15 L 攪拌式發酵槽、5 L 氣舉式發酵槽)探討對 *R. glutinis* 濃度之影響

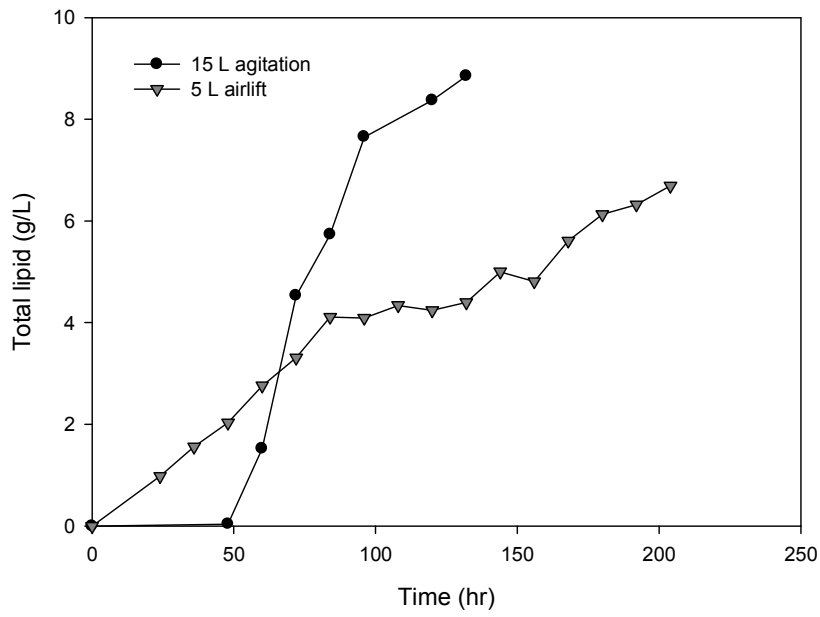


圖 4-24 改變生物反應器(15 L 攪拌式發酵槽、5 L 氣舉式發酵槽)探討對 *R. glutinis* 油脂累積之影響

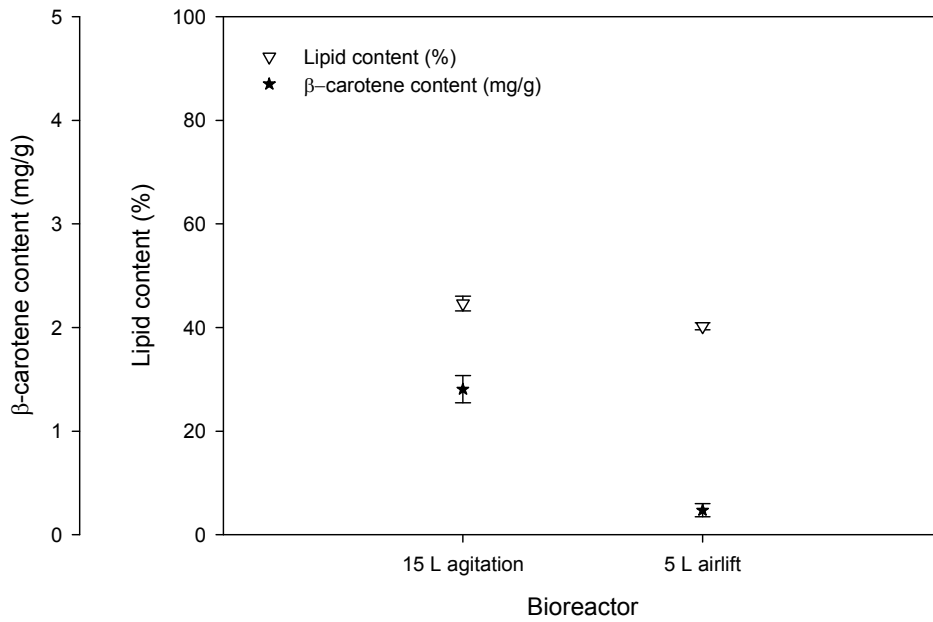


圖 4-25 改變生物反應器(15 L 攪拌式發酵槽、5 L 氣舉式發酵槽)探討對 *R. glutinis* 累積油脂含量及 β -胡蘿蔔素含量之影響

表 4-14 改變生物反應器(15 L 攪拌式發酵槽、5 L 氣舉式發酵槽)批次發酵策略之動力參數

Bioreactor	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Max. lipid productivity (g/L/h)	Max. β -carotene content (mg/g)	Max. β -carotene productivity (mg/L/h)
15 L agitation	20.6	0.51	45.62	0.19	1.66	0.5
5 L airlift	16.6	0.12	46.80	0.05	0.36	0.08

4.5 50 L 氣舉式發酵槽 饋料發酵程序

4.5.1 饋料方式之影響

為了提升 *Rhodotorula glutinis* 生長速率，並且提升油脂及 β -胡蘿蔔素產率，本實驗利用 50 L 氣舉式發酵槽進行 *Rhodotorula glutinis* 放大培養，且在饋料體積上分為 3.5 L 與 7 L，探討不同饋料方式(一次批次饋料、等速批次饋料、指數型批次饋料)對於 *Rhodotorula glutinis* 生長影響。

第一部分饋料體積為 3.5 L 之實驗結果如圖 4-26、4-27、4-28、4-29，由批次發酵實驗中能發現 *Rhodotorula glutinis* 在第 48 小時其菌體達最大濃度 24 g/L，故選擇在第 48 小時進行饋料；饋料方式從一次性饋料、等速饋料、指數型饋料，其最大生長速率分別為 0.4、0.45、0.49 g/L/h，以指數型饋料方式得到較好的效果，推測以菌體生長速率作為推斷饋料速率的關鍵是有利於菌體生長；最大油脂生產速率為 0.45、0.35、0.23 g/L/h，最大 β 胡蘿蔔素生產速率為 0.82、0.76、0.43 mg/L/h，產物生產速率方面皆以一次性饋料的方式能得到最佳結果，推測在一次饋料後，槽體內的碳源濃度大幅提升，造成培養基中碳氮比提高，促使菌體會將過多的碳源進行油脂累積以及生產 β -胡蘿蔔素，與搖瓶結果相符，相反地，等速及指數型饋料的碳氮比較低，對於菌體而言，會將低濃度的碳源做為生產菌體，將菌體生長速率提高。

第二部分以 7 L 的饋料體積進行探討增加饋料濃度與饋料時間不同對於 *Rhodotorula glutinis* 生長代謝之影響，一次性饋料方法分別在第 48、96 小時各饋料 3.5 L 粗甘油，而指數型饋料是一次配足 7 L 粗甘油並在第 48 小時進行饋料，其結果顯示如圖 4-30、4-31、4-32，饋料方式從一次性饋料、指數型饋料，其最大生長速率分別為 0.42、0.55 g/L/h，其結果與第一部分相同，指數型饋料方式能提升菌體生長速率，且隨著饋料濃度提升其生長速率可從 0.49 g/L/h 增加至

0.55 g/L/h；最大油脂生產速率為 0.44、0.37 g/L/h，最大 β -胡蘿蔔素生產速率為 0.99、0.46 mg/L/h，其結果皆以一次性饋料為最佳，然而增加饋料濃度並無法明顯提升油脂與 β -胡蘿蔔素生產速率。

結論，以指數型饋料方式有助於提升菌體生長速率，且增加饋料濃度也能明顯地提升生長速率，除此之外，指數型饋料方式也能避免饋料物中的抑制物會對菌體造成破害；對於產物生產速率方面，以一次性饋料的方式最佳，推測利用短時間內提升槽體內的碳氮比是有助於油脂或 β -胡蘿蔔素的合成，但提升饋料濃度並無明顯地提升產物合成速率。

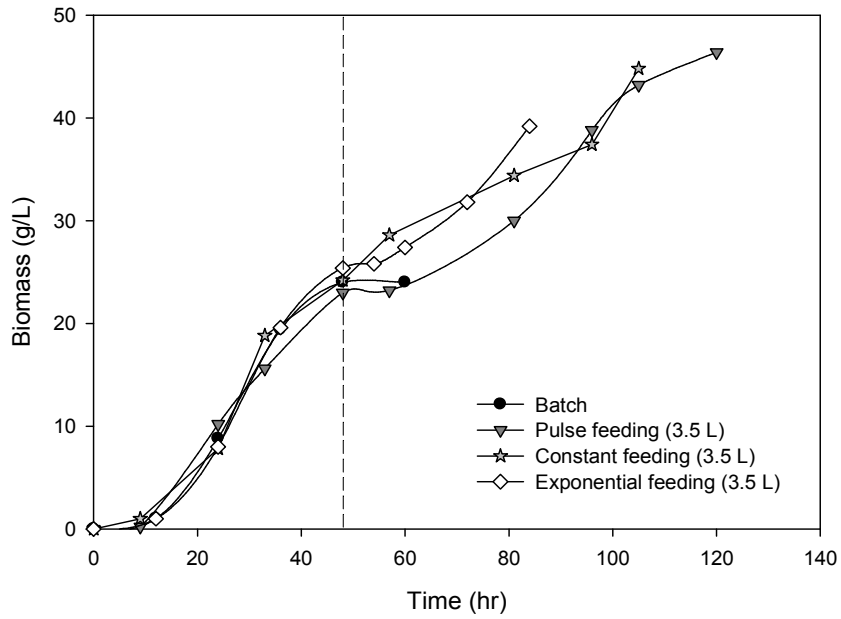


圖 4-26 改變饋料方式探討對 *R. glutinis* 生長濃度之影響(一次性饋料、等速饋料、指數型饋料；饋料粗甘油濃度 686 g/L；第 48 小時進行饋料)

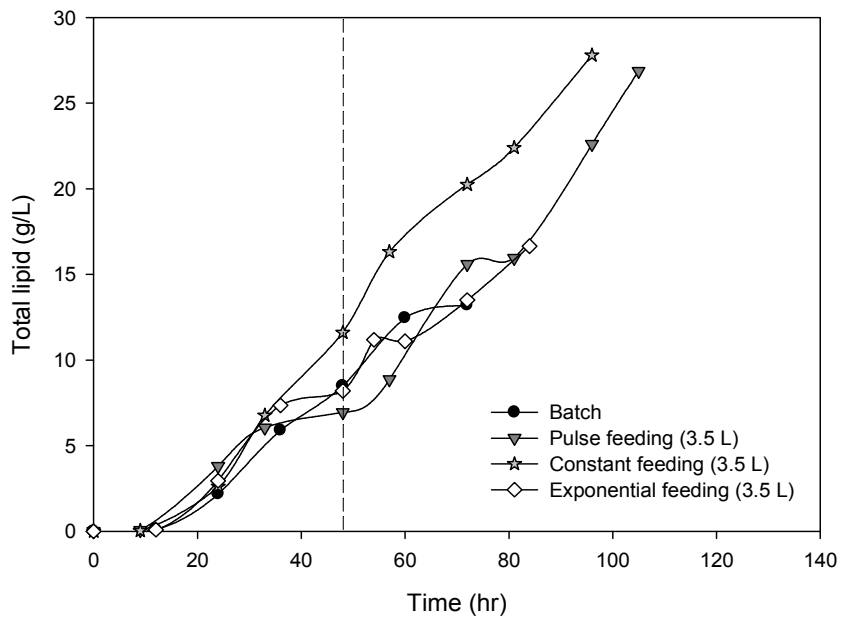


圖 4-27 改變饋料方式探討對 *R. glutinis* 油脂累積之影響 (一次性饋料、等速饋料、指數型饋料；饋料粗甘油濃度 686 g/L；第 48 小時進行饋料)

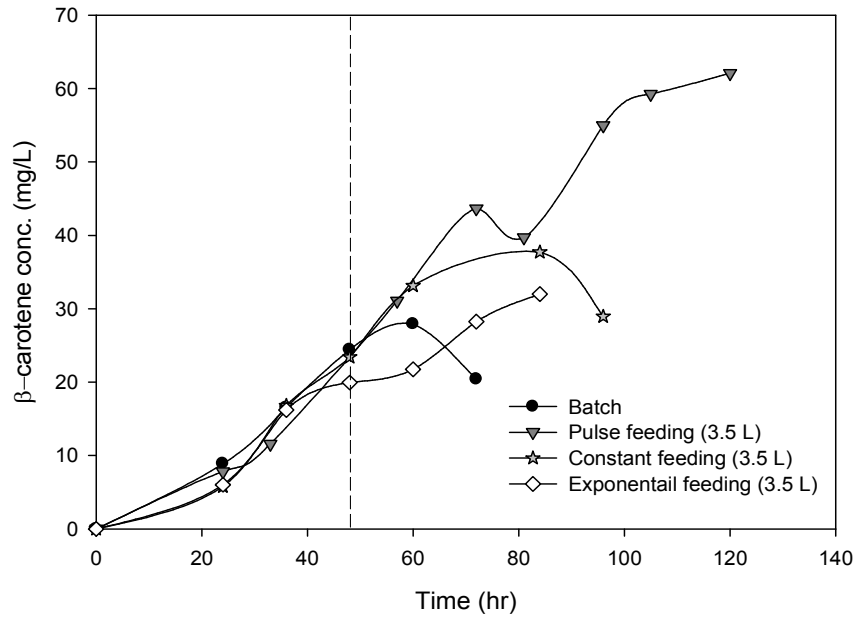


圖 4-28 改變饋料方式探討對 *R. glutinis* 生產 β -胡蘿蔔素之影響 (一次性饋料、等速饋料、指數型饋料；饋料粗甘油濃度 686 g/L；第 48 小時進行饋料)

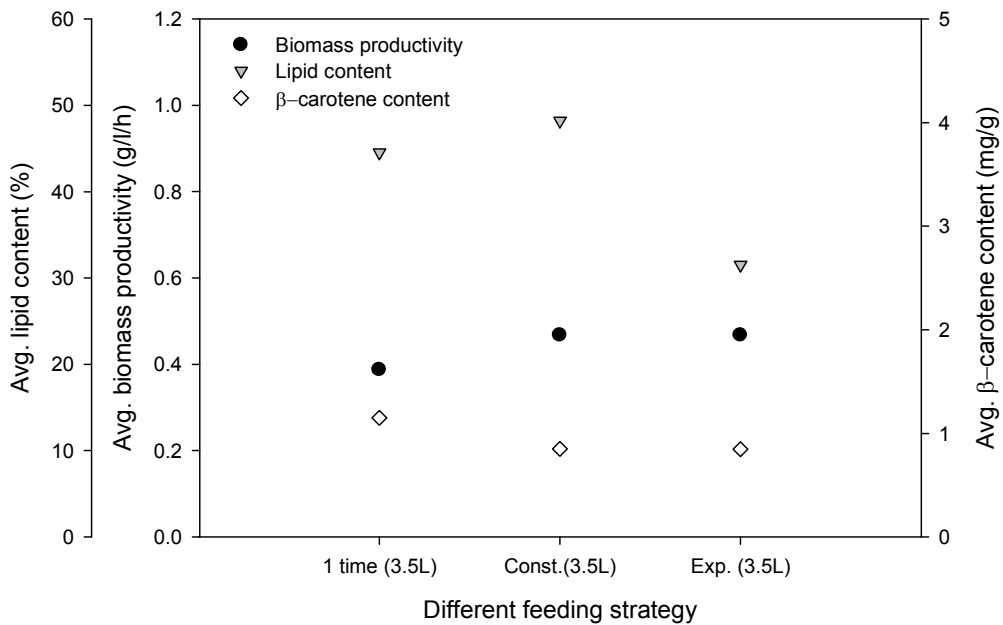


圖 4-29 改變饋料方式探討對 *R. glutinis* 積油脂含量及 β -胡蘿蔔素含量之影響 (一次性饋料、等速饋料、指數型饋料；饋料粗甘油濃度 686 g/L)

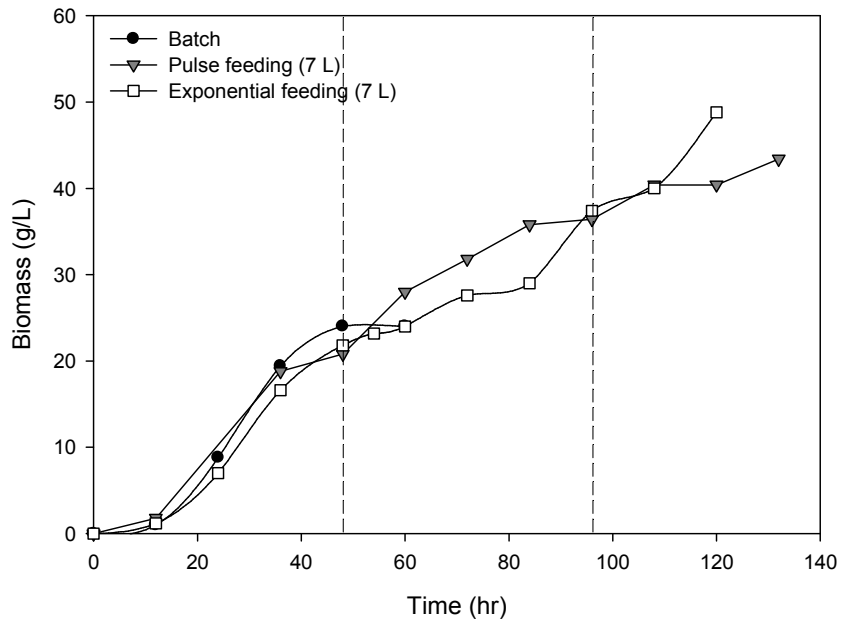


圖 4-30 改變饋料方式探討對 *R. glutinis* 生長濃度之影響(一次性饋料、指數型饋料；饋料粗甘油總濃度 1371 g/L；第 48、96 小時進行饋料)

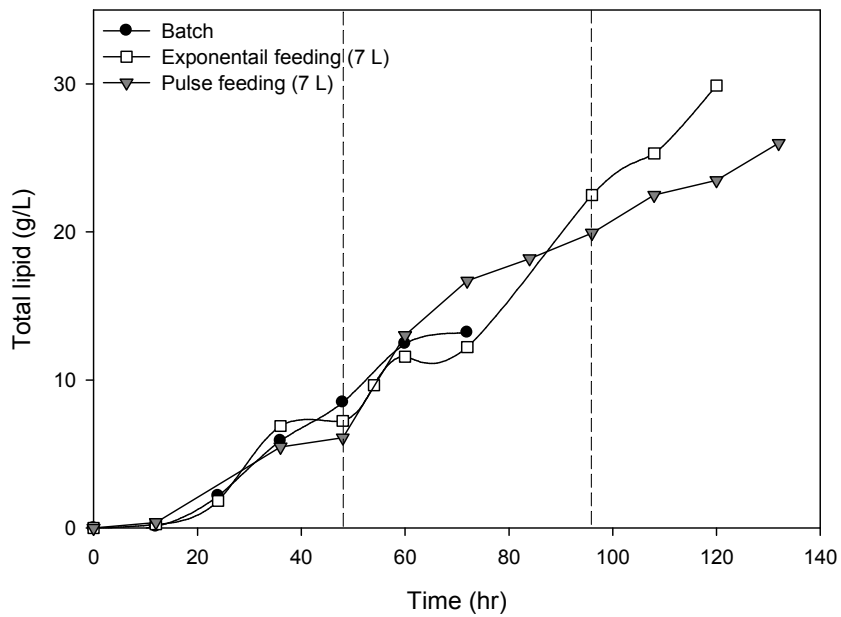


圖 4-31 改變饋料方式探討對 *R. glutinis* 油脂累積之影響 (一次性饋料、指數型饋料；饋料粗甘油濃度 1371 g/L；第 48、96 小時進行饋料)

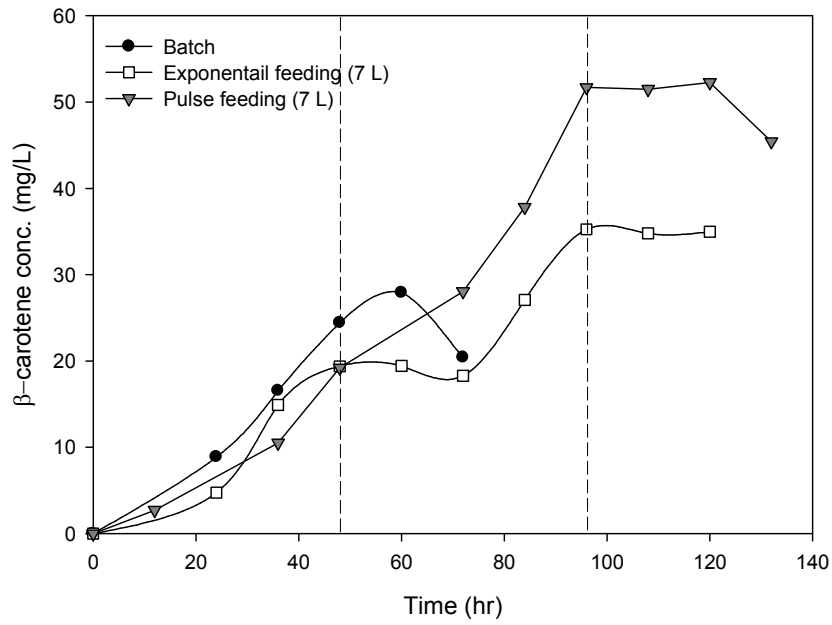


圖 4-32 改變饋料方式探討對 *R. glutinis* 生產 β -胡蘿蔔素之影響 (一次性饋料、指數型饋料；饋料粗甘油濃度 1371 g/L；第 48、96 小時進行饋料)

表 4-15 改變饋料方式(一次性饋料、等速饋料、指數型饋料)及饋料濃度(686、1371 g/L) 饋料批次發酵策略之動力參數

Feeding method (culture volume, L)	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Max. lipid content (% w/w)	Max. lipid productivity (g/L/h)	Max. β -carotene content (mg/g)	Max. β -carotene productivity (mg/L/h)
Batch	24	0.64	55.45	0.22	1.16	0.53
Fed-batch 1 pulse feeding (3.5 L)	46.4	0.40	62.20	0.45	1.42	0.82
Fed-batch Constant rate feeding (3.5 L)	44.8	0.45	62.10	0.35	1.16	0.76
Fed-batch Exponential feeding (3.5 L)	39.2	0.49	43.30	0.23	1.06	0.43
Fed-batch 1 pulse feeding (7 L)	43.4	0.42	59.88	0.44	1.42	0.99
Fed-batch Exponential feeding (7 L)	48.8	0.55	63.20	0.37	1.22	0.46

4.6 5 L、20 L、50 L 氣舉式生物反應器與 15 L 攪拌式生物反應器之綜合探討

將上述 5 L、20 L、50 L 氣舉式生物反應器與 15 L 攪拌式生物反應器之實驗數據分成油脂與 β -胡蘿蔔素兩大部分探討，結果顯示如表 4-15、4-16。首先在菌體濃度與菌體生長速率方面，皆能從 5 L 與 20 L 氣舉式發酵槽之數據中發現隨著通氣量的增加，*R. glutinis* 濃度及生長速率也隨之提升，推測提升通氣量也能提升氧氣質傳速率，而氧氣為 *R. glutinis* 生長的重要影響因素之一，故在溶氧高的狀態下能提升菌體濃度；而在 50 L 氣舉式發酵槽批次饋料實驗中，在相同饋料體積下，最大菌體濃度沒有明顯的影響，但在菌體生長速率方面有些許不同，其中以指數型饋料成為最佳促進菌體生長的方式，並能達到 0.49 g/L/h，結論，以菌體生長速率作為推斷饋料速率是促進菌體生長的重要關鍵。

累積油脂部分，在最大油脂生產速率方面，皆能從 5 L 與 20 L 氣舉式發酵槽皆明顯的隨通氣量提升而提升；而在 50 L 氣舉式發酵槽中，以一次性饋料方式能得到最佳結果，可達到 0.45 g/L/h，推測一次性供給大量碳源濃度，並不會促進菌體濃度，反而將多餘的碳源轉為累積油脂或是合成 β -胡蘿蔔素。

β -胡蘿蔔素部分，在 5 L 與 20 L 氣舉式發酵槽部分，隨著通氣量增加，最大 β -胡蘿蔔素生產速率也隨之提升，分別可達到 0.22 mg/L/h、0.27 mg/L/h；50 L 氣舉式發酵槽部分，以一次性饋料方式得到最佳結果，可達到 0.99 mg/L/h。

表 4-16 對於累積油脂比較，各發酵槽實驗之動力學參數整理

Fermentation Strategy (Aeration, Pressure)	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 (1 vvm,0 atm)	16.6	0.12	42.1 ± 3	6.7	0.32	0.05
Batch- 5 L (1.5 vvm, 0 atm)	18.0	0.31	50.8 ± 4	10.0	0.99	0.13
Batch- 5 L (2 vvm, 0 atm)	25.4	0.38	49.5 ± 8	16.8	0.48	0.21
Batch- 5 L (2.5 vvm, 0 atm)	23.4	0.46	30.7 ± 8	8.4	0.20	0.22
Batch- 5 L (1.5 vvm, 0.2 atm)	22.2	0.21	39.8 ± 6	9.3	0.26	0.06
Batch- 5 L (1.5 vvm, 0.5 atm)	17.0	0.26	51.7 ± 7	8.5	0.23	0.19
Batch- 20 L (0.75 vvm, 0 atm)	10.6	0.08	35.1 ± 5	3.7	0.07	0.09
Batch- 20 L (1.25 vvm, 0 atm)	18.6	0.41	30.0 ± 8	5.7	0.14	0.13
Batch- 20 L (1.5 vvm, 0 atm)	23.2	0.65	37.4 ± 3	9.6	0.20	0.27
Batch- 15 L* (1 vvm, 0.5 atm)	20.6	0.51	31.6 ± 8	8.9	0.22	0.19
Batch- 50 L (1.5 vvm, 0 atm)	24	0.64	29.8 ± 17	13.2	0.62	0.22
Fed-batch- 50 L 1 pulse feeding (1.5 vvm, 0 atm, 3.5 L)	46.4	0.40	44.52 ± 11	26.9	0.76	0.45
Fed-batch- 50 L Constant rate feeding (1.5 vvm, 0 atm, 3.5 L)	44.8	0.45	48.20 ± 13	27.8	0.67	0.35

Fed-batch- 50 L						
Exponential feeding (1.5 vvm, 0 atm, 3.5 L)	39.2	0.49	31.5 ± 12	16.7	0.90	0.23
Fed-batch-50 L						
1 pulse feeding (1.5 vvm, 0 atm, 7 L)	43.4	0.42	45.79 ± 14	26.0	0.80	0.44
Fed-batch- 50 L						
Exponential feeding (1.5 vvm, 0 atm, 7 L)	48.8	0.55	43.17 ± 14	29.9	0.84	0.37

Batch- 15 L* : 攪拌式發酵槽

表 4-17 對於 β -胡蘿蔔素比較，各發酵槽實驗之動力學參數整理

Fermentation Strategy (Aeration, Pressure)	Max. biomass (g/L)	Max. biomass productivity (g/L/h)	Avg. β -carotene content (mg/g)	Max. β -carotene conc. (mg/L)	Max. β -carotene productivity (mg/L/hr)
Batch- 5 L (1 vvm, 0 atm)	16.6	0.12	0.2 ± 0.1	4.60	0.08
Batch- 5 L (1.5 vvm, 0 atm)	18.0	0.31	0.88 ± 0.6	36.8	0.45
Batch- 5 L (2 vvm, 0 atm)	25.4	0.38	1.21 ± 1.1	26.9	0.69
Batch- 5 L (2.5 vvm, 0 atm)	23.4	0.46	0.57 ± 0.3	22.8	1.10
Batch- 5 L (1.5 vvm, 0.2 atm)	22.2	0.21	1.89 ± 0.4	46.2	0.83
Batch- 5 L (1.5 vvm, 0.5 atm)	17.0	0.26	0.42 ± 0.4	24.5	0.74
Batch- 20 L (0.75 vvm, 0 atm)	10.6	0.08	0.85 ± 0.2	10.1	0.18
Batch- 20 L (1.25 vvm, 0 atm)	18.6	0.41	0.89 ± 0.3	22.4	0.20
Batch- 20 L (1.5 vvm, 0 atm)	23.2	0.65	0.7 ± 0.3	22.7	1.50
Batch- 15 L* (1 vvm, 0.5 atm)	20.6	0.51	1.48 ± 0.2	34.1	0.50

Batch- 50 L (1.5 vvm, 0 atm)	24	0.64	0.98 ± 0.1	27.91	0.53
Fed-batch- 50 L 1 pulse feeding (1.5 vvm, 0 atm, 3.5 L)	46.4	0.40	1.15 ± 0.3	62.09	0.82
Fed-batch- 50 L Constant rate feeding (1.5 vvm, 0 atm, 3.5 L)	44.8	0.45	0.85 ± 0.2	37.69	0.76
Fed-batch- 50 L Exponential feeding (1.5 vvm, 0 atm, 3.5 L)	39.2	0.49	0.85 ± 0.1	32.00	0.43
Fed-batch-50 L 1 pulse feeding (1.5 vvm, 0 atm, 7 L)	43.4	0.42	0.92 ± 0.2	53.35	0.99
Fed-batch- 50 L Exponential feeding (1.5 vvm, 0 atm, 7 L)	48.8	0.55	1.13 ± 0.3	52.24	0.46

Batch- 15 L* : 攪拌式發酵槽

表 4-18 累積油脂部分，發酵槽實驗與文獻之比較

Fermentation strategy (aeration, feeding volume)	Carbon source	Feeding solution components	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	Glucose + (NH ₄) ₂ SO ₄	86.2	25.0	11.3	0.29	0.14	(Zhang, Zhang et al. 2014)
Batch 2 L stirred tank (2 vvm)	Glycerol	-----	8.17	52.9	4.33	0.07	0.06	(Saenge, Cheirsilp et al. 2011)
Fed-batch 2 L stirred tank (2 vvm)	Glycerol	Crude glycerol	10.1	60.7	6.10	0.03	0.09	(Saenge, Cheirsilp et al. 2011)
Fed-batch 5 L stirred tank with 3 LEDs (1 vvm)	Glucose	Glucose	45.1	54.5 ± 2	24.6	0.19	0.39	(張智勇, 2011)
Fed-batch 5 L stirred tank (1 vvm)	Crude glycerol	Crude glycerol	42.2	60.7	5.01	0.22	0.05	(余依嬾, 2012)

Batch									
5 L airlift (2 vvm)	Crude glycerol	-----	25.4	49.5 ± 8	16.8	0.52	0.21		This study
Batch									
20 L airlift (1.5 vvm)	Crude glycerol	-----	23.2	37.4 ± 3	9.6	0.24	0.27		This study
Batch									
15 L stirred tank (1 vvm)	Crude glycerol	-----	20.6	31.6 ± 8	8.9	0.23	0.19		This study
Fed-batch									
50 L airlift 1 pulse feeding (1.5 vvm, 3.5 L)	Crude glycerol	Crude glycerol	46.4	44.5 ± 11	26.9	0.84	0.45		This study

表 4-19 β -胡蘿蔔素部分，發酵槽實驗與文獻之比較

Fermentation strategy (aeration, feeding volume)	Carbon source	Feeding solution components	Max. biomass (g/L)	Avg. β -carotene content (mg/g)	Max. β -carotene conc. (mg/L)	Yield ($Y_{X/S}$, mg/g)	Max. β -carotene productivity (mg/L/hr)	Reference
Fed-batch 5 L stirred tank	Glucose	Glucose + (NH ₄) ₂ SO ₄	86.2	25.0	11.3	0.11	0.14	(Zhang, Zhang et al. 2014)
Continuous 3 L stirred tank (1 vvm, dilution rate 0.24 hr ⁻¹)	Radish brine	-----	1.4	-----	0.08	0.03	0.02	(Malisorn and Suntornsuk 2009)
Batch 14 L stirred tank (0.5 vvm)	Molasses	-----	12.2	-----	34.0	0.85	1.79	(Bhosale and Gadre 2001)
Batch 2 L stirred tank (2 vvm)	Glycerol	-----	8.2	15.4	125.8	2.04	1.75	(Saenge, Cheirsilp et al. 2011)
Fed-batch 2 L stirred tank (2 vvm)	Glycerol	Crude glycerol	10.1	13.0	131.5	0.70	1.83	(Saenge, Cheirsilp et al. 2011)

<hr/>									
Batch									
5 L airlift (2.5 vvm)	Crude glycerol	-----	23.4	0.57 ± 0.3	22.8	0.61	1.10		This study
<hr/>									
Batch									
20 L airlift (1.5 vvm)	Crude glycerol	-----	23.2	0.70 ± 0.3	22.7	0.69	1.50		This study
<hr/>									
Batch									
15 L stirred tank (1 vvm)	Crude glycerol	-----	20.6	1.48 ± 0.2	34.1	0.87	0.50		This study
<hr/>									
Fed-batch									
50 L airlift 1 pulse feeding (1.5 vvm, 7 L)	Crude glycerol	Crude glycerol	43.4	0.92 ± 0.2	53.4	1.74	0.99		This study
<hr/>									

4.7 體積溶氧係數 k_{La}

由於提升通氣量，能使得槽體內溶氧量提升，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體積溶氧係數與菌體生長速率之間的關係。實驗結果如圖 4-33，結果顯示 k_{La} 會隨著通氣量上升而上升，且與菌體生長速率成正向關係，但在 2.5 vvm 與 2 vvm 通氣量下的 k_{La} 相差不大，推測因發酵槽高度受限，氧氣滯留率低，導致 k_{La} 並沒有隨著通氣量的提升而明顯的變化。除此之外，本實驗皆有對各種發酵槽(15 L 攪拌式發酵槽、50 L 氣舉式發酵槽)進行 k_{La} 測試，其結果如表 4-19，結果顯示 50 L 氣舉式發酵槽通氣量在 1.5 vvm 下的 k_{La} 最高，可達到 0.870 min^{-1} ，且在最大菌體生長速率為最佳，可達到 0.639 g/L/hr 。結論體積溶氧係數與菌體生長速率有正向關係。

在相同的通氣量，使用不同的發酵槽，將得到不同的 k_{La} 值，如 5 L 氣舉式發酵槽與 50 L 氣舉式發酵槽，分別得到 0.176 、 0.870 min^{-1} ，在最大菌體生長速率分別得到 0.305 、 0.639 g/L/hr ，推測不同的發酵槽，受高度不同的影響，使得氧氣之滯留率不同，最終導致體積溶氧係數有所差別，故提升氧氣的滯留率與菌體生長速率具有相關性。

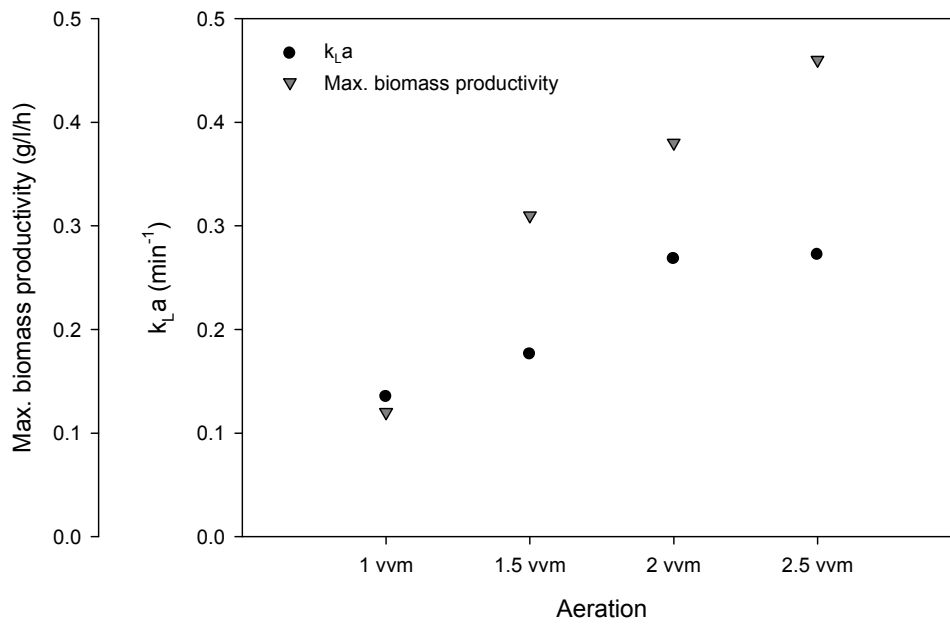


圖 4-33 利用動態溶氧方法來測時不同發酵槽(5 L 氣舉式發酵槽、15 L 氣舉式發酵槽、50 L 氣舉式發酵槽)並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

表 4-20 利用動態溶氧方法來測時不同發酵槽(5 L 氣舉式發酵槽、15 L 氣舉式發酵槽、50 L 氣舉式發酵槽)並探討對 *R. glutinis* 生長之影響

Bioreactor (aeration, agitation)	k_{La} (min^{-1})	Max. biomass productivity (g/L/h)
5 L airlift (1 vvm, 0 rpm)	0.135	0.117
5 L airlift (1.5 vvm, 0 rpm)	0.176	0.305
5 L airlift (2 vvm, 0 rpm)	0.268	0.383
5 L airlift (2.5 vvm, 0 rpm)	0.272	0.458
15 L agitation (1 vvm, 300 rpm)	0.661	0.508
50 L airlift (1.5 vvm, 0 rpm)	0.870	0.639

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

本實驗利用 *Rhodotorula glutinis* 培養，且分成三大部分：(1)探討 β -胡蘿蔔素的影響因子，(2)利用 5 L 氣舉式發酵槽探討 *R. glutinis* 的生長與通氣量、壓力之關係，(3)利用 50 L 氣舉式發酵槽放大培養並探討饋料方式的影響性，以下整理出下列幾點結論：

1. 培養基介質改變(逆滲透蒸餾水含有機氮、海洋深層水含有機氮、海洋深層水不含有機氮)得到兩個結論，皆含有氮源的條件下，改變溶劑的不同，發現海水中的礦物質是有助於菌體生長；以海水做為培養基介質下，無添加有機氮源的實驗數據顯示能提高 20 % 的油脂含量，是有助於油脂累積。
2. 固定氮源濃度改變碳源濃度(30 g/L、60 g/L、120 g/L)，在碳源濃度高的情況下，對於菌體濃度是沒有明顯的影響，反而在於油脂累積與 β -胡蘿蔔素合成能明顯提升，由此推測 *R. glutinis* 在指數生長期後及 pH 大幅下降後便不再繼續利用碳源生長，反而將所剩的碳源進行油脂和 β -胡蘿蔔素的合成。
3. 碳源濃度固定改變氮源濃度(4 g/L、2 g/L、1 g/L)，在氮源濃度高的情況下，結果顯示與菌體濃度沒有明顯關係，而在 β 胡蘿蔔素合成部分，隨著氮源濃度下降反而上升，推測是受到氮源限制及 pH 的影響。
4. 照光能提升菌體濃度以及 β -胡蘿蔔素含量，油脂累積下降；反之，不照光下，菌體濃度與 β -胡蘿蔔素含量較低但對於油脂累積能有所提升，推測 *R. glutinis* 將剩餘的碳源進而生產 β -胡蘿蔔素以防止活性氧的破壞，導致油脂含量會因照光而有所下降。

5. 添加 H₂O₂ 濃度(0 mM、0.25 mM、0.5 mM、1 mM)的影響，顯示在 H₂O₂ 的濃度為 0.5 mM 時，β-胡蘿蔔素濃度可達到 27.75 mg/l，而在 1 mM 時，β-胡蘿蔔素濃度為 19.56 mg/L。適量地添加 H₂O₂ 對於 *R. glutinis* 濃度、β-胡蘿蔔素有所影響，且與細胞內的過氧化氫酶的活性有很大的關係。
6. 探討添加乙醇對於 *Rhodotorula glutinis* 生長的影響性，結果顯示添加 0.4 % 的乙醇相較於控制組明顯地可以提高 1.422 mg/g，與文獻針結果不相符，添加乙醇無法明顯提升 β-胡蘿蔔素含量。
7. 隨著通氣量提升皆能正向影響 *R. glutinis* 生長、油脂生產速率及 β-胡蘿蔔素生產速率，但不利於累積油脂。
8. 隨著壓力增加對菌體整體生長及代謝過程沒有正向關係，唯獨適當調整壓力控制方能提高其中一項產物的產量。
9. 15 L 攪拌式發酵槽能利用攪拌葉片將槽體內的溶氧量迅速提高，所以對於好氧的 *R. glutinis* 能快速生長，最大生長速率達到 0.51 g/L/h，故氣舉式發酵槽需改變發酵策略以提升 *R. glutinis* 生長速率及產物的產率。
10. 在饋料方式(一次型饋料、等速饋料、指數型饋料)不同之下，以指數型饋料方式有助於提升菌體生長速率，且增加饋料濃度也能明顯地提升生長速率；對於產物生產速率方面，以一次性饋料的方式最佳，推測利用短時間內提升槽體內的碳氮比是有助於油脂或 β-胡蘿蔔素的合成，但提升饋料濃度並無明顯地提升產物合成速率。
11. 體積溶氧系數與菌體生長速率有正向關係。

5.2 未來展望

對於後續之研究，有以下幾點值得發展與探討：

首先，利用基因改殖或突變方式進行菌種改良，找出具備高油脂與 β -胡蘿蔔素含量之菌種，接著將初始氮源濃度提高，且培養在體積溶氧系數高的生物反應器中，而在提升體積溶氧系數的部分，也可以探討發酵槽內的氣泡大小之影響性，並能在低通氣量下，卻能有高體積溶氧系數的方法，藉由培養在高 k_La 的環境下能短時間內提升菌數量，當菌數量達到某一程度之後，再以一次性饋料方式，饋入高碳源濃度之培養液(不含氮源)，進而提高整體油脂及 β -胡蘿蔔素的合成速率，最後可將 *R. glutinis* 與藻類進行串聯培養，將酵母菌所排出的 CO_2 能提供藻類生長，進而提高整體油脂生產速率及達到固碳的效果。

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。
- 孫證雄(2011)。自營環境下培養柵藻生成葉黃素與超臨界流體萃取葉黃素之探討。東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。
- 張智勇(2011)。探討不同發效策略對於 *Rhodotorula glutinis* 生長及累積油脂之影響。東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。
- 張瑛芳(2005)。護眼維生素 A。葉子出版股份有限公司。
- 陳儷娟(2013)。探討共培養粘紅酵母菌與柵藻對菌體生長與油脂累積之影響。東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。
- 趙婷, 林孔亮 and 惠伯棣 (2010). "微生物源類胡蘿蔔素研究进展." 食品科學 **31**(23): 461-467.
- (2000). Opinion of the scientific committee on food on b-carotene from *Blakeslea reispora*. E. COMMISSION.
- Aksu, Z. and A. T. Eren (2007). "Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*." Biochemical Engineering Journal **35**(2): 107-113.
- Bauernfeind, J. (1981). Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors.
- Bhosale, P. and R. Gadre (2001). " β -Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **26**: 327-332.
- Bhosale, P. and R. V. Gadre (2001). "Production of beta-carotene by a *Rhodotorula glutinis* mutant in sea water medium." Bioresour Technol **76**(1): 53-55.
- Braunwald, T., L. Schwemmlein, S. Graeff-Hönninger, W. French, R. Hernandez, W. Holmes and W. Claupein (2013). "Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*." Applied Microbiology and Biotechnology **97**(14): 6581-6588.
- Cheng, L.-C., J.-Y. Wu and T.-L. Chen (2002). "A pseudo-exponential feeding method for control of specific growth rate in fed-batch cultures." Biochemical Engineering

Journal **10**: 227-232.

Chi, Z., Y. Zheng, A. Jiang and S. Chen (2011). "Lipid Production by Culturing Oleaginous Yeast and Algae with Food Waste and Municipal Wastewater in an Integrated Process." Applied Biochemistry and Biotechnology **165**(2): 442-453.

Chinnasamy, S., A. Bhatnagar, R. W. Hunt and K. C. Das (2010). "Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications." Bioresource Technology **101**(9): 3097-3105.

Coultate, T. P. (1996). Food-The Chemistry of Its Components.

Cutzu, R., A. Coi, F. Rosso, L. Bardi, M. Ciani, M. Budroni, G. Zara, S. Zara and I. Mannazzu (2013). "From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant." World Journal of Microbiology and Biotechnology **29**(6): 1009-1017.

Dworecka-Kaszak, B. and M. Kizerwetter-Swida (2011). " Pseudomycelium forming *Rhodotorula*- unusual picture of biofilm." Medical Mycology **18**(2): 74-78.

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. alık (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.

El-Banna, A. A. (2012). "Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*." Food and Nutrition Sciences **03**(01): 64-71.

Ershov Iu, V., A. A. Dmitrovskii, O. V. Poluliakh, O. I. Podoprigora and V. Bykhovskii (1992). "Enzymatic conversion of torulene and torularhodine into retinal." Prikl Biokhim Mikrobiol **28**(5): 680-684.

Frengova, G., E. Simova, K. Pavlova, D. Beshkova and D. Grigorova (1994). "Formation of carotenoids by *rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate." Biotechnol Bioeng **44**(8): 888-894.

Gu, W. L., G. H. An and E. A. Johnson (1997). "Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **19**(2): 114-117.

- Hennekens, C. H. (1997). " β -Carotene supplementation and cancer prevention." Nutrition **13**(7-8): 697-699.
- Hiremath, A., M. Kannabiran and V. Rangaswamy (2011). "1,3-Propanediol production from crude glycerol from Jatropha biodiesel process." N Biotechnol **28**(1): 19-23.
- 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.
- Iigusa, H., Y. Yoshida and K. Hasunuma (2005). "Oxygen and hydrogen peroxide enhance light-induced carotenoid synthesis in *Neurospora crassa*." FEBS Lett **579**(18): 4012-4016.
- 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.
- Kesava, S. S., G.-H. An, C.-H. Kim, S.-K. Rhee and E.-S. Choi (1998). "An industrial medium for improved production of carotenoids from a mutant strain of *Phaffia rhodozyma*." Bioprocess Engineering **19**(3): 165-170.
- Lammers, P. J., B. J. Kerr, M. S. Honeyman, K. Stalder, W. A. Dozier, 3rd, T. E. Weber, M. T. Kidd and K. Bregendahl (2008). "Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens." Poult Sci **87**(1): 104-107.
- Lee, P. C., W. G. Lee, S. Y. Lee and H. N. Chang (2001). "Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source." Biotechnol Bioeng **72**(1): 41-48.
- 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.
- Luo, H., Y. Niu, C. Duan, H. Su and G. Yan (2013). "A pH control strategy for increased β -carotene production during batch fermentation by recombinant industrial wine yeast." Process Biochemistry **48**(2): 195-200.

- 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.
- Mantzouridou, F., T. Roukas and B. Achatz (2005). "Effect of oxygen transfer rate on β -carotene production from synthetic medium by *Blakeslea trispora* in shake flask culture." Enzyme and Microbial Technology **37**(7): 687-694.
- Margalith, P. and S. Meydav (1968). "Some observations on the carotenogenesis in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*." Phytochemistry **7**(5): 765-768.
- Marova, I., M. Carnecka, A. Halienova, M. Certik, T. Dvorakova and A. Haronikova (2012). "Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production." J Environ Manage **95 Suppl**: S338-342.
- 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.
- 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.
- Minkevich, I. G., E. G. Dedyukhina and T. I. Chistyakova (2010). "The effect of lipid content on the elemental composition and energy capacity of yeast biomass." Appl Microbiol Biotechnol **88**(3): 799-806.
- Morrison, E. M. (2007). "High corn prices and abundant biofuel coproducts spark interest in feed-corn substitutes." Agricultural Utilization Research Institute.
- Nishino, H., M. Murakoshi, T. Ii, M. Takemura, M. Kuchide, M. Kanazawa, X. Y. Mou, S. Wada, M. Masuda, Y. Ohsaka, S. Yogosawa, Y. Satomi and K. Jinno (2002). "Carotenoids in cancer chemoprevention." Cancer Metastasis Rev **21**(3-4): 257-264.
- 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.
- Papanikolaou, S. and G. Aggelis (2011). "Lipids of oleaginous yeasts. Part II:

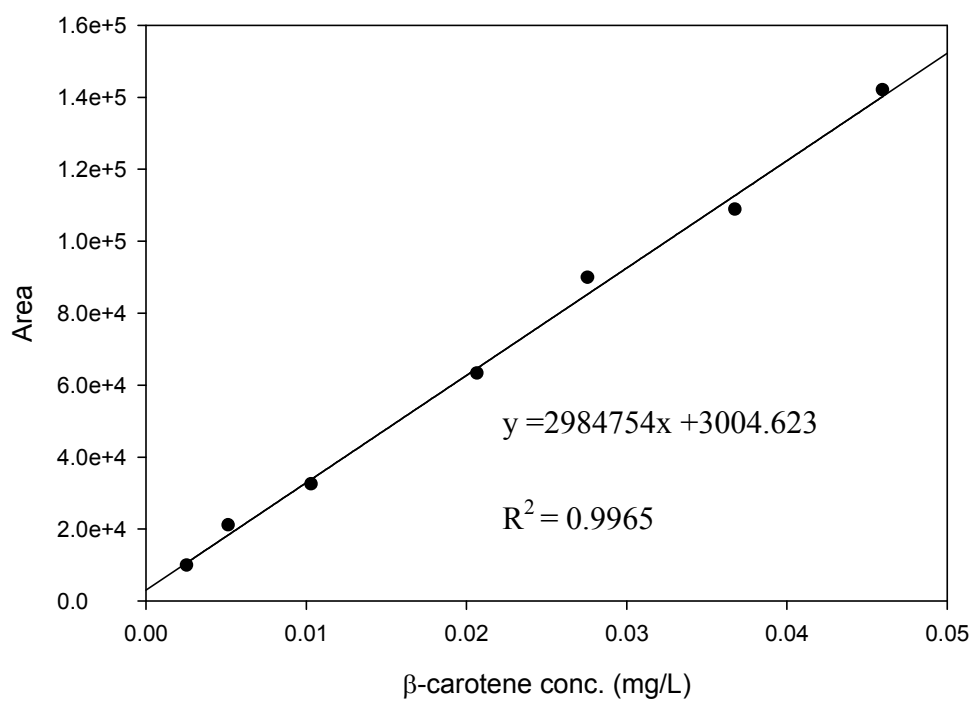
- Technology and potential applications." European Journal of Lipid Science and Technology **113**(8): 1052-1073.
- Ping, Z., Y. Mingzhe and W. Hong. (2007). "Study on Dissolved Oxygen Control Method Based on International Evaluation Benchmark." Information and control **36**(2): 199-203.
- Ratledge, C. (1991). "Microorganisms for lipids." Acta Biotechnologica **11**(5): 429-438.
- Roadjanakamolson, M. and W. Suntornsuk (2010). "Production of beta-carotene-enriched rice bran using solid-state fermentation of *Rhodotorula glutinis*." J Microbiol Biotechnol **20**(3): 525-531.
- Ruhal, R., S. Aggarwal and B. Choudhury (2011). "Suitability of crude glycerol obtained from biodiesel waste for the production of trehalose and propionic acid." Green Chemistry **13**(12): 3492-3498.
- 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.
- Sakai, H., T. Nakanishi, A. Tada, W. Milsi and S. Komemushi' (2001). "Activation of Torularhodin Production by *Rhodotorula glutinis* Using Weak White Light Irradiation." Journal of Bioscience and Bioengineering **92**: 294-297.
- Schievano, A., G. D'Imporzano and F. Adani (2009). "Substituting energy crops with organic wastes and agro-industrial residues for biogas production." J Environ Manage **90**(8): 2537-2541.
- Stelmachowski, M. (2011). "Utilization of glycerol, a by-product of the transesterification process of vegetable oils a review." Ecological Chemistry And Engineering S **18**: 9-30.
- Tada, M. and M. Shiroishi (1982). "Mechanism of Photoregulated Carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* V. Photoinduction of 3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl Coenzyme A Reductase." Plant and Cell Physiology **23**(4): 615-621.
- Thompson, J. C. and B. B. He (2006). "Characterization of crude glycerol from biodiesel production." Applied Engineering in Agriculture **22**: 261-265.

- Venkata Subhash, G. and S. Venkata Mohan (2011). "Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Aspergillus* sp. using corncob waste liquor as a substrate." Bioresour Technol **102**(19): 9286-9290.
- Weeks, O. B., F. K. Saleh, M. Wirahadikusumah and R. A. Berry (1973). "Photoregulated carotenoid biosynthesis in non-photosynthetic microorganisms." Pure Appl Chem **35**(1): 63-80.
- Wu, K.-J., Y.-H. Lin, Y.-C. Lo, C.-Y. Chen, W.-M. Chen and J.-S. Chang (2011). "Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a *Klebsiella* sp. HE1 strain via anaerobic fermentation." Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers **42**(1): 20-25.
- Yan, G., Z. Hua, D. Liu, G. Du and J. Chen (2006). "Influence of oxygen level on oxidative stress response of *Bacillus* sp. F26 to menadione." Process Biochemistry **41**(4): 764-769.
- Yan, G. L., H. Y. Liang, Z. Q. Wang, X. F. Yang, D. Liu, J. F. Liu and C. Q. Duan (2011). "Important role of catalase in the production of beta-carotene by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* under H₂O₂ stress." Curr Microbiol **62**(3): 1056-1061.
- Ye, Z. W., J. G. Jiang and G. H. Wu (2008). "Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects." Biotechnol Adv **26**(4): 352-360.
- 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*." Journal of the American Oil Chemists' Society **60**(7): 1281-1286.
- Zhang, Z., X. Zhang and T. Tan (2014). "Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation." Bioresour Technol **157**: 149-153.
- Zhu, Z., S. Zhang, H. Liu, H. Shen, X. Lin, F. Yang, Y. J. Zhou, G. Jin, M. Ye, H. Zou and Z. K. Zhao (2012). "A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*." Nature Communications **3**: 1112.

附錄

附錄 A

β-胡蘿蔔素檢量線

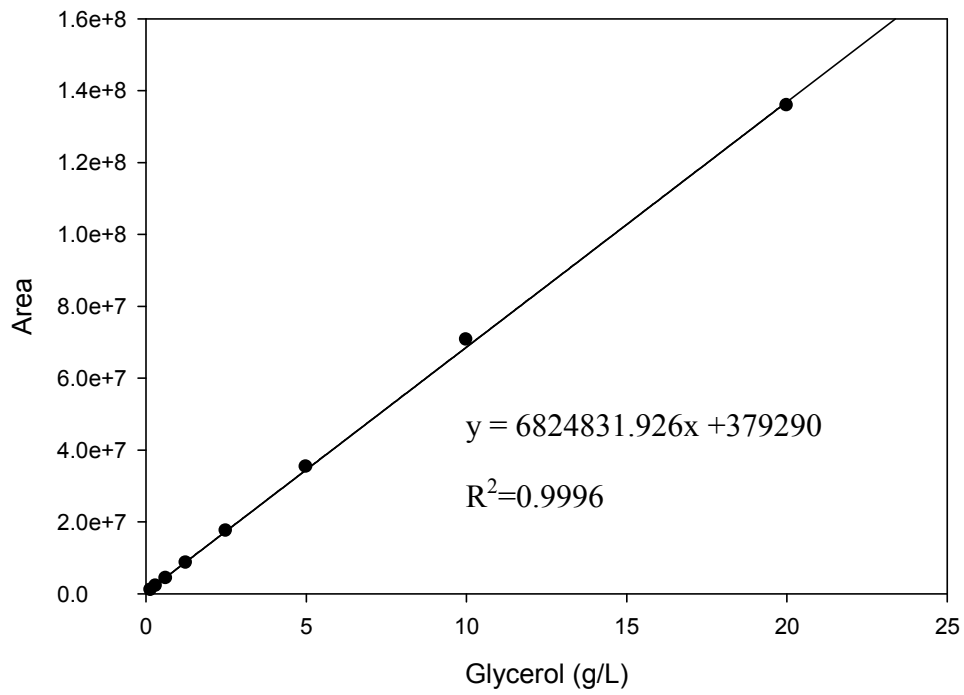


β-carotene 標準檢量線方程式：

$$\beta\text{-carotene conc.} = (\text{Peak area} - 3004.623) / 2984754$$

附錄 B

甘油檢量線



Glycerol 標準檢量線方程式：

$$\text{Glycerol conc.} = (\text{Peak area} - 379290) / 6824931.926$$

附錄 C

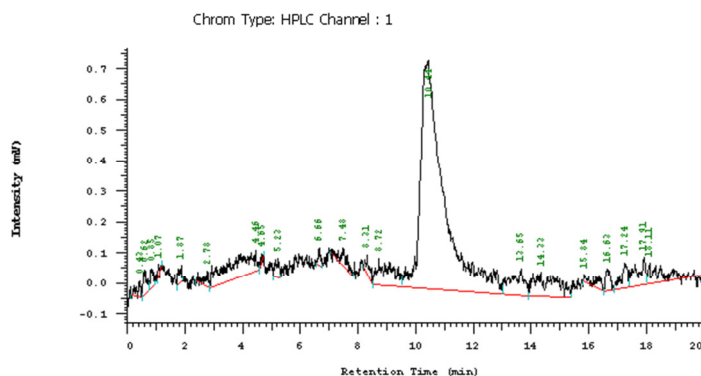
HPLC 圖譜 β -胡蘿蔔素標準品

D-2000Elite: HORM Series: 0963 Report: original System: Sys 1

D-2000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 2014/06/18 11:29 上午 Reported: 2014/07/24 01:03 下午
 Processed: 2014/06/18 11:49 上午

Data Path: C:\WIN32APP\D2000HSM\HORM\DATA\0963\
 Processing Method: beta-carotene
 System(acquisition): Sys 1 Series: 0963
 Application: HORM Vial Number: 1
 Sample Name: STANDARD001 Vial Type: STD1
 Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 20.0 μ l
 Sample Description:



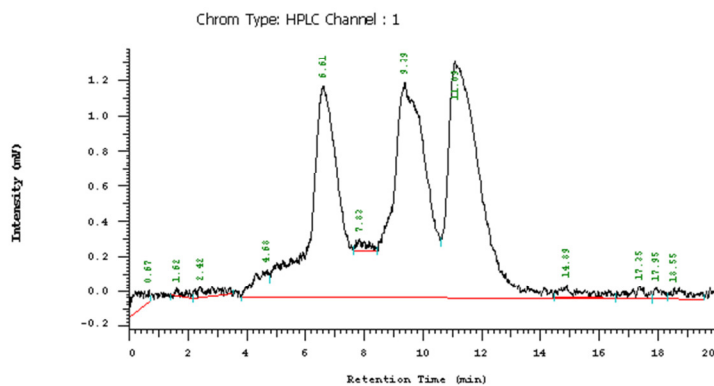
HPLC 圖譜 β -胡蘿蔔素樣品 (葡萄糖作為碳源)

D-2000Elite: HORM Series: 0848 Report: original System: Sys 1

D-2000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 2014/01/18 12:45 上午 Reported: 2014/07/24 01:25 下午
 Processed: 2014/01/18 01:05 上午

Data Path: C:\WIN32APP\D2000HSM\HORM\DATA\0848\
 Processing Method: beta-carotene
 System(acquisition): Sys 1 Series: 0848
 Application: HORM Vial Number: 7
 Sample Name: UNKNOWN007 Vial Type: UNK
 Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 20.0 μ l
 Sample Description:

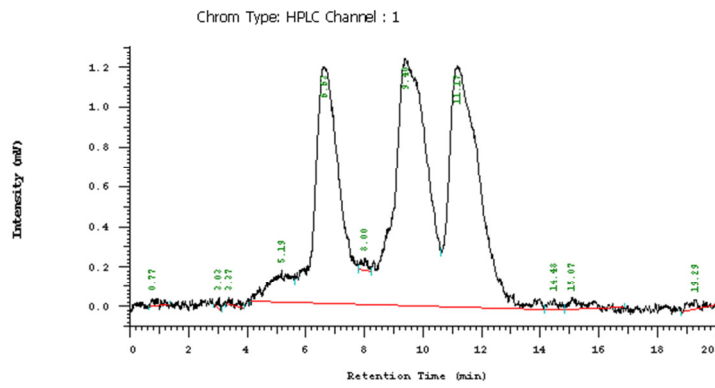


HPLC 圖譜 β -胡蘿蔔素樣品 (粗甘油作為碳源)

D-2000Elite: HORM Series: 0848 Report: original System: Sys 1

D-2000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 2014/01/18 02:30 上午 Reported: 2014/07/24 01:08 下午
Data Path: C:\WIN32APP\D2000HSM\HORM\DATA\0848\ Processed: 2014/01/18 02:50 上午
Processing Method: beta-carotene
System(acquisition): Sys 1 Series: 0848
Application: HORM Vial Number: 12
Sample Name: UNKNOWN012 Vial Type: UNK
Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 20.0 μ L
Sample Description:





2012/09/17 實驗室成員於司馬庫斯巨木合影