

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏宏偉博士

Advisor : Hong-Wei Yen, Ph.D.

探討固態及液態深層發酵對 *Rhodotorula glutinis* 生產 β -胡蘿

蔔素之影響

Effects of solid and liquid submerged fermentation on the
formation of β -carotene in *Rhodotorula glutinis*

研究生：蘇國智撰

Graduate student : Guo-Chih Su

中華民國 105 年 7 月

July, 2016

中文摘要

黏紅酵母菌 *Rhodotorula glutinis* (BCRC 22360) 是一株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。本實驗分別探討固態及液態發酵對於 *R. glutinis* 菌體生長以及其代謝產物 β -胡蘿蔔素的影響。固態方面，基質選用同為蛋雞飼料的玉米，期望可直接應用於增色飼料中，減少萃取、純化等成本；液態方面，利用生質柴油副產物作為培養基碳源。藉由改變環境因子來提高兩種發酵型態的 β -胡蘿蔔素產量。

在固態搖瓶實驗中，分別做了基質選擇、環境因子的影響，藉此增加 β -胡蘿蔔素的提升，其中使用玉米作為基質表現較佳，在環境因子最適化的實驗中，以含水量 65 %、粒徑小於 0.85 mm 培養 96 hr 效果較好， β -胡蘿蔔素可達到 2.45 mg/kg 發酵物；在將滅菌後基質進行切塊的實驗中，有進行切塊的 β -胡蘿蔔素從原本 2.45 mg/kg 發酵物提升至 2.96 mg/kg 發酵物；在基質中添加碳源(蔗糖)以及氮源(硫酸銨)的實驗中，相較於未添加者， β -胡蘿蔔素由 2.96 mg/kg 發酵物顯著提升至 3.67 mg/kg 發酵物。

由固態搖瓶放大至 2 L 固態旋轉瓶，分別進行了單瓶基質量、改變培養方式的探討，在單瓶基質量的實驗中，以 200 g 的基質量最符合成本以及效益，在有 2 L/min 的通氣下， β -胡蘿蔔素可達到 4.14 mg/kg 發酵物；在改變培養方式的實驗中，間歇性通入飽和氣體的方式對 β -胡蘿蔔素的產量有明顯助益， β -胡蘿蔔素

可從 4.14 mg/kg 發酵物提升至 6.39 mg/kg 發酵物。

在液態搖瓶實驗中，進行了添加誘導物(柑橘類果皮萃取液、植物油)以及改變 C/N ratio 的實驗，在添加柑橘類果皮萃取液的實驗中，於各時段添加萃取液對於 β -胡蘿蔔素並無明顯助益，菌量受到萃取溶劑(乙醇)以及萃取成分(檸檬烯)的抑制而降低；在添加植物油的實驗中，以軟棕櫚油 2.5 % 添加效果最好，菌量及 β -胡蘿蔔素分別得到 11.5 g/L、0.33 mg/g；在改變 C/N ratio 的實驗中，隨著 C/N ratio 提高，菌量以及 β -胡蘿蔔素皆有所提升，實驗結果以碳源(粗甘油 60 g/L)氮源(硫酸銨 1 g/L)較好，可得到菌量 8.2 g/L、 β -胡蘿蔔素 0.26 mg/g。

由搖瓶油脂添加實驗放大至 5 L 攪拌式發酵槽，可以發現軟棕櫚油 2.5 % 的添加對於菌體生長有很顯著的效益，其菌量可達到 29.8 g/L， β -胡蘿蔔素則與控制組差異不大，皆可得到約 0.35 mg/g 的濃度；放大至 5 L 氣舉式發酵槽，其菌量可得 24.5 g/L， β -胡蘿蔔素可得 0.29 mg/g。兩發酵槽對比，5 L 攪拌式發酵槽對於菌量、 β -胡蘿蔔素以及脂質方面效果皆較為出色。

由搖瓶改變 C/N ratio 實驗放大至 50 L 氣舉式發酵槽，藉由饋料方式 Fed batch 來提高培養期間培養基中的 C/N ratio， β -胡蘿蔔素並無太大差異約在 0.2 mg/g，而 lipid content 有了顯著提升，由 40 % 提升至接近 60 %，應是菌體將多餘碳源轉而累積油脂。

蛋雞餵養實驗中，將固態發酵及液態發酵物添加至飼料中，添加比例為 10 %，連續餵養 144 hr，固態部分，蛋黃所含 β -胡蘿蔔素為 2.18 mg/kg egg yolk，液態部分為 3.73 mg/kg egg yolk，對比於控制組的 1.53 mg/kg egg yolk 分別提高 2.5 倍及 1.4 倍

關鍵字: *R. glutinis*、 β -胡蘿蔔素、培養型態、環境因子、誘導物

Abstract

Rhodotorula glutinis (BCRC 22360) is an oleaginous yeast that can accumulate high content of total lipid. In addition for total lipids production, *R. glutinis* was well known as having 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 high cost of commercializing biosiesel production has been a thorny issue by using the microbial oils as the feedstock. In this study, the effects of liquid submerged fermentation on the cell growth and β -carotene production was investigated by using crude glycerol as carbon source. The corn is used as the substrate to reduce the cost for the extraction and the purification process.

The effects of medium ingredients and environmental cultivation conditions on the growth of cell and the content of β -carotene in the shaker flask experiments. It was found that under the condition of 65 % content of water, the particle sizes which less than 0.85 mm, and cultivated for 96 hours can obtain the best consequence that the amount of fermentates of β -carotene reach 2.45 mg/kg. By dicing the substrate after sterilizing can enhance β -carotene from 2.45 to 2.96 mg/kg fermentates significantly. By adding 20 g/L of sucrose and 5 g/L of ammonium sulfate can enhance β -carotene from 2.96 to 3.67 mg/kg fermentates significantly.

The effects on the growth of cell and β -carotene were evaluated by adding different volume of substrate in a 2 L rotary fermenter, powdering during the period of cultivating and methods of ventilation. While adding 200 g substrates in the 2 L rotary fermenter, the fermentates of β -carotene we obtained was 4.14 mg/kg and it fitted the economic benefits. The content of β -carotene was increased significantly

from 4.14 to 6.389 mg/kg with the saturated gas pass into periodicity.

The effects of C/N ratio and adding inducer in the medium on the growth of cell and β -carotene in the shaker flask by cultivating in the liquid fermentation were evaluated. The result demonstrated that a monoterpene ethanol solution did not increase the content of β -carotene significantly. Additionally, the growth of the cell was suppressed. However, it was found that adding 2.5 % palm oil can promote the growth of cell and β -carotene, which could obtain 11.5 g/L of biomass and 0.33 mg/g of β -carotene. In C/N ratio experiment, it seems that the increase of C/N ratio can increase the cells growth and β -carotene content. It can get 8.2 g/L of biomass and 0.26 mg/g of β -carotene by using 60 g/L crude glycerol and 1 g/L ammonium sulfate.

The experiment of adding 2.5 % palm oil was discussed that scaled up by using the 5 L stirred tank reactor and 5 L airlift. It was found that adding palm oil can promote the growth of cell significantly, which could obtain 29.8 g/L of biomass and 0.35 mg/g of β -carotene by using 5 L stirred tank reactor. While getting 24.5 g/L of biomass and 0.29 mg/g of β -carotene by using 5 L airlift. Comparing the two reactors, 5 L stirred tank reactor was better than another one.

The experiment of changing C/N ratio was discussed that scaled up by using the 50 L airlift. The fed batch operation with the disposable feeding could enhance the lipid content from 41 to 60 %, but not promote for synthesizing the β -carotene, which could obtain 0.2 mg/g of β -carotene.

Keywords: *Rhodotorula glutinis* 、 type of fermentations 、 β -carotene 、 environmental cultivation conditions 、 inducer

目錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	III
目錄.....	V
圖目錄.....	X
表目錄.....	XII
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2.1 黏紅酵母菌- <i>Rhodotorula glutinis</i>	2
2.2 生質柴油副產物-粗甘油(Crude glycerol).....	3
2.3 類胡蘿蔔素簡介.....	5
2.3.2 β -胡蘿蔔素的生理活性.....	8
2.3.3 影響微生物生成 β -胡蘿蔔素因子.....	10
2.3.4.1 油脂.....	12
2.3.4.2 軟棕櫚油.....	13
2.3.5 固態發酵.....	14
2.3.5.1 固態發酵與液態發酵之差異.....	14
2.3.5.2 固態發酵之優缺點.....	15
2.3.5.3 固態發酵之應用.....	16
2.3.5.4 固態發酵培養重要參數.....	17
2.3.6 玉米.....	19
第三章 實驗材料與方法.....	20

3.1 實驗材料.....	20
3.1.1 實驗酵母菌種及菌株.....	20
3.1.2 實驗藥品.....	21
3.3 分析方法.....	25
3.3.1 菌體濃度分析方法.....	25
3.3.2 甘油濃度分析方法.....	25
3.3.3 總脂質濃度分析方法.....	25
3.3.4 β -胡蘿蔔素濃度分析方法.....	26
3.4 實驗方法.....	27
3.4.1 原始菌種保存.....	27
3.4.2 培養基組成.....	27
3.4.2.1 種子培養基 (Seed culture medium, SM).....	27
3.4.2.2 發酵培養基 (Fermentation medium, FM).....	28
3.4.3 接菌.....	28
3.5 實驗架構.....	29
3.6 實驗培養條件.....	30
3.6.1 固態搖瓶批次發酵程序.....	30
3.6.1.1 不同基質之影響.....	30
3.6.1.2 菌體培養時間之影響.....	30
3.6.1.3 不同含水量之影響.....	31
3.6.1.4 不同粒徑大小之影響.....	31
3.6.1.5 滅菌過之基質進行切塊之影響.....	32
3.6.1.6 添加碳氮源(蔗糖、硫酸銨)於基質中之影響.....	32
3.6.1.7 不同光照強度之影響.....	34

3.6.2 2 L 旋轉瓶固態批次發酵程序.....	35
3.6.2.1 單瓶 2L 固態旋轉瓶填裝基質量之影響.....	35
3.6.2.2 改變培養方式.....	35
3.6.2.3 間歇性通入飽和氣體-進氣量之影響.....	37
3.6.3 深層液態搖瓶批次發酵程序.....	38
3.6.3.1 添加柑橘類果皮萃取液之影響.....	38
3.6.3.2 添加植物油之影響.....	38
3.6.3.3 不同 C/N ratio 之影響.....	39
3.6.4 5 L 攪拌式發酵槽批次發酵程序.....	40
3.6.4.1 添加 2.5 % 軟棕櫚油、1 g/L Tween 80 之影響.....	40
3.6.5 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序.....	40
3.6.5.1 添加 2.5 % 軟棕櫚油、1 g/L Tween 80 之影響.....	40
3.6.6 50 L 氣舉式發酵槽發酵程序.....	41
3.6.6.1 Fed-batch- C/N ratio 之影響.....	41
3.7.1 搖瓶發酵培養裝置圖 (250 ml).....	42
3.7.2 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵培養裝置圖.....	42
3.7.3 5 L 攪拌式發酵槽批次發酵培養裝置圖.....	43
3.7.4 50 L 氣舉式發酵槽饋料批次培養裝置圖.....	43
第四章 結果與討論.....	45
4.1 固態搖瓶批次發酵程序.....	45
4.1.1 不同基質之影響.....	45
4.1.2 菌體培養時間之影響.....	48
4.1.3 不同含水量之影響.....	49
4.1.4 不同粒徑大小之影響.....	50

4.1.5 滅菌過之基質進行切塊之影響	52
4.1.6 添加碳氮源(蔗糖、硫酸銨)於基質中之影響	53
4.1.7 不同光照強度之影響	55
4.2 2 L 旋轉瓶固態批次發酵程序	56
4.2.1 單瓶 2 L 固態旋轉瓶填裝基質量之影響	57
4.2.2 改變培養方式	58
4.2.3 間歇性通入飽和氣體-通氣量之影響	60
4.3 深層液態搖瓶批次發酵程序	61
4.3.1 添加柑橘類果皮萃取液之影響	61
4.3.2 添加植物油之影響	63
4.3.3 不同 C/N ratio 之影響	68
4.4 5 L 攪拌式發酵槽批次發酵程序	69
4.4.1 添加 2.5 % 軟棕櫚油、1 g/L Tween 80 之影響	69
4.5 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序	72
4.5.1 添加 2.5 % 軟棕櫚油、1 g/L Tween 80 之影響	72
4.6 50 L 氣舉式發酵槽發酵程序	74
4.6.1 Fed-batch-低 C/N ratio 之影響	74
4.7 蛋雞餵養實驗	76
第五章 結論與未來展望	82
5.1 結論	82
5.2 未來展望	85
參考文獻	86
附錄	91

附錄 A.....	91
附錄 B.....	92
附錄 C.....	93
作者簡歷.....	96

圖目錄

圖 2-1 β -胡蘿蔔素結構.....	7
圖 2-2 β -胡蘿蔔素代謝路徑.....	12
圖 3-1 黏紅酵母菌 <i>Rhodotorula glutinis</i> BCRC 22360 生長在 agar plate 上之外觀	20
圖 3-2 搖瓶實驗裝置圖.....	42
圖 3-3 5 L 氣舉式發酵槽裝置實圖(左)、示意圖(右).....	42
圖 3-4 5 L 攪拌式發酵槽裝置圖.....	43
圖 3-5 50 L 氣舉式發酵槽裝置圖.....	43
圖 3-6 固態旋轉發酵槽裝置圖.....	44
圖 4-1 不同基質對於 <i>R. glutinis</i> 生產 β -胡蘿蔔素之影響.....	46
圖 4-2 黃豆(左)、糙米(中)、苦蕎麥(右)培養情形.....	46
圖 4-3 紅薏仁(左)、紅豆(中)、綠豆(右)培養情形.....	46
圖 4-4 玉米培養情形.....	46
圖 4-5 不同基質本身 v.s 發酵培養物之 β -胡蘿蔔素濃度.....	47
圖 4-6 <i>R. glutinis</i> 生成 β -胡蘿蔔素之時間變化量.....	48
圖 4-7 不同含水量對於 <i>R. glutinis</i> 生產 β -胡蘿蔔素之影響.....	49
圖 4-8 不同粒徑大小對 <i>R. glutinis</i> 生成 β -胡蘿蔔素之影響.....	50
圖 4-9 粒徑小的(less than 0.85 mm)生長情形.....	51
圖 4-10 粒徑中的(between 0.85 mm and 2 mm)生長情形.....	51
圖 4-11 粒徑大的(lager than 2 mm)生長情形.....	51
圖 4-12 基質滅菌後切塊示意圖.....	52
圖 4-13 滅菌過基質切塊之影響.....	52
圖 4-14 固定硫酸銨添加量 0.09 g 改變蔗糖添加量(0.09、0.18、0.36 g)之影響.....	54

圖 4-15 固定蔗糖添加量 0.36 g 改變硫酸銨添加量(0.09、0.18、0.36 g)之影響	54
圖 4-16 不同光照度對 <i>R. glutinis</i> 生產 β -胡蘿蔔素之影響	55
圖 4-17 改變單瓶固態旋轉瓶之基質量對 <i>R. glutinis</i> 生產 β -胡蘿蔔素之影響	57
圖 4-18 不同培養方式(1) 於培養期間對基質進行磨碎；(2) 間歇性通入飽	59
圖 4-19 間歇性通氣-進氣量之影響	60
圖 4-20 柑橘類果皮萃取液添加時間點對 <i>R. glutinis</i> 之影響	62
圖 4-21 不同植物油 10% 以及 1 g/L Tween 80 對 <i>R. glutinis</i> 之影響	65
圖 4-22 不同濃度之軟棕櫚油添加對 <i>R. glutinis</i> 之影響	65
圖 4-23 不同程度之 C/N ratio[(Low, 30:1)、(Medium, 60:1)、(High, 120:1)]對	68
圖 4-24 5 L 攪拌式發酵槽-添加軟棕櫚油 2.5% 之影響	70
圖 4-25 軟棕櫚油 2.5% 添加-5 L 氣舉式 v.s 5 L 攪拌式發酵槽	73
圖 4-26 Fed batch-control	75
圖 4-27 Fed batch-高 C/N ratio 之影響	75
圖 4-28 蛋雞飼養實圖	77
圖 4-29 蛋雞進食(混合菌粉)實圖	77
圖 4-30 控制組蛋黃最終顏色變化	78
圖 4-31 液態 10% 蛋黃最終顏色變化	78
圖 4-32 固態 10% 蛋黃最終顏色變化	78

表目錄

表 2-1 粗甘油微量元素分析表(Thompson et al., 2006).....	3
表 2-3 各種類胡蘿蔔素的功能 (孫證雄, 2011).....	6
表 2-4 常見類胡蘿蔔素的微生物來源(El-Banna 2012)	6
表 3-1 黏紅酵母菌所使用之藥品清單	21
表 3-2 實驗儀器清單	23
表 3-3 種子培養基	27
表 3-4 發酵培養基	28
表 4-1 各基質培養前後，提升之 β -胡蘿蔔素總量.....	47
表 4-2 各油品脂肪酸組成	66
表 4-3 各油品價格	67
表 4-4 5 L 攪拌式發酵槽添加 2.5 % 軟棕櫚油之動力學參數變化	70
表 4-5 添加 2.5 % 軟棕櫚油脂肪酸組成變化.....	71
表 4-6 5 L 氣舉式發酵槽添加 2.5 % 軟棕櫚油之動力學參數變化	73
表 4-7 50 L 氣舉式發酵槽 Fed batch 之動力學參數變化	74
表 4-8 固態及液態培養條件及所得菌體之 β -胡蘿蔔素含量.....	76
表 4-9 不同飼料連續餵養 144 hr，雞蛋所含之 β -胡蘿蔔素.....	79
表 4-10 國際標準成人一天所需維生素 A 攝取量 (行政院衛生署).....	79
表 4-11 β -胡蘿蔔素部分，發酵槽實驗與文獻之比較.....	80

第一章 緒論

近年來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)。然而每生產 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。

使用 *R. glutinis* 進行培養，除了能產出微生物油脂作為生質柴油的料源外，也會產出高單價的 β -胡蘿蔔素。而 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，目前市面上類胡蘿蔔素的相關產品大多以人工化學合成為主，但人工合成色素有傷害人體健康的疑慮。近年來在養殖業，為了生產紅心雞蛋，主要是通過在飼料中添加人工色素來達到目的。但是由於廣大消費者對人工合成色素的毒性有疑慮，故許多國家停用毒性較大的化學合成色素，開始注重研究無毒害副作用的天然增色飼料，而目前在國內生產紅心雞蛋的飼料中，增色元素主要是從天然動植物中所萃取出來的，以微生物生產為來源是較為少數的。(Sofia Fredriksson 2006)

綜合上述，本實驗將探討利用固態及液態發酵對於 *R. glutinis* 菌體生長以及其代謝產物 β -胡蘿蔔素的影響。固態方面，基質選用同為雞飼料的玉米，期望可直接應用於增色飼料中，減少萃取、純化等成本；液態方面，利用生質柴油副產物作為培養基碳源。希望藉由改變環境因子來提高兩種發酵型態的 β -胡蘿蔔素產量。

第二章 文獻回顧

2.1 黏紅酵母菌-*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(余依環, 2012)。是一種好氧性菌體，在外觀上，細胞的型態呈卵圓形，菌落為紅色，並廣泛的分佈在各種生態中，適合生長在 20~30 °C，pH5~6 的環境。*R. glutinis* 是一株被廣泛用來生產類胡蘿蔔素的酵母菌(Simpson et al., 1975)，其工業優勢在於能在許多便宜的農業原料中生長來生產類胡蘿蔔素，例如：甘蔗汁、乳清、葡萄汁、甜菜糖蜜、大豆、水解綠豆粉、玉米粉提取物、甘蔗糖蜜等(Aksu and Eren, 2005)。並且 *R. glutinis* 的單細胞有較快的生長速度以及能利用低成本發酵培養基的特色，與藻類、其它真菌和細菌相比更具有優勢(Suntornsuk et al., 2008)。

2.2 生質柴油副產物-粗甘油(Crude glycerol)

粗甘油之甘油組成占總重 95.3 % 一般以低價轉賣於甘油精煉廠，因為甘油的應用非常廣泛，可添加於化妝品、食品、藥品或作為各種化學品生產的原料，由於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、蛋白質及礦物質及微量元素等 (J. C. Thompson et al., 2006)，因此使得純化粗甘油在食品、製藥和化妝品工業上得花費昂貴的純化步驟 (Eda et al., 2008)。故開發粗甘油新用途，是迫切需要的。在微生物培養基中，細胞需要碳源來合成產物，在文獻指出，以粗甘油作為 *Pichia pastoris* 發酵培養基的碳源，所得到的細胞濃度及紅血球生成素是以純甘油作為發酵碳源的 1.4 倍，顯示出粗甘油對於生物體有正面的影響性 (Eda et al., 2008)，粗甘油所含的微量元素如表 2-1，而微量元素對細胞生理功能的影響如表 2-2 (Kenneth Todar, 2004)。

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

Feedstock	Rapeseed	Canola	Soybean	Crambe
Calcium (ppm)	24	19.7	11.0	163.3
Potassium (ppm)	BDL	BDL	BDL	216.7
Magnesium (ppm)	4.0	5.4	6.8	126.7
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。

表 2-2 微量元素對細胞生理功能之影響

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

2.3 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-but-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 2-3。

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 2-4。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 2-3 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 2-4 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>

2.3.1 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 2-1 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。

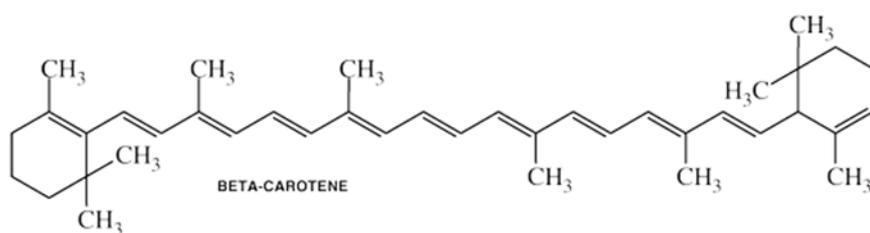


圖 2-1 β -胡蘿蔔素結構

2.3.2 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, Murakoshi 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)。

2.3.3 影響微生物生成 β -胡蘿蔔素因子

(1) 溫度

環境中，溫度對於微生物的生長和產物累積有重大的影響性，由於溫度會直接的影響細胞中酵素的反應及活性，又間接與菌體的生長和產物相關，文獻中指出，當溫度高於 44 °C 或低於 18 °C 時，會嚴重抑制菌體生長速率和養分利用 (Sheng et al., 2011)。

(2) 光

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

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

對於某些含有光接受器的真菌，如 *Penicillium brevicompactum*、*Aspergillus nidulans* 等來說，雖無法像植物能將光能直接轉換成可以利用的能源，但能透過照光之方式，去改變體內蛋白質合成的途徑，因而間接影響到菌體的生長與代謝產物的形成。而文獻中也有探討不同光強度對菌體之影響，以光強度控制在 3 盞 LED(3849.9 $\mu\text{mole/s/m}^2$) 下達到 2.6 mg/L 相較於控制組 1.2 mg/L 提高 1.16 倍，

所以對 *R. glutinis* 來說光確實也是影響生成 β -胡蘿蔔素的因素之一(Zhiping Zhang et al., 2014)。

(3) 碳源

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

(4) C/N ratio

影響微生物生長最重要的就是營養源，直接關乎培養基的組成，特別是基質組成中占重要比重的碳源和氮源，影響著微生物生理狀態的程度更直接。許多研究得知 C/N 高低對生物體合成類胡蘿蔔素有顯著的效果(Vustin et al., 2004)，在合成類胡蘿蔔素方面有研究指出 C/N 低時細胞生長雖有較好的表現，但在類胡蘿蔔素方面表現卻變差了，相反地，在 C/N 高時細胞生長卻會受到高濃度碳源所抑制，而類胡蘿蔔素濃度則提高(YU-ICHI YAMANE et al., 1997)故在選擇最適宜的 C/N ratio 來培養酵母菌是使提高類胡蘿蔔素產量的關鍵。

2.3.4 影響生成類胡蘿蔔素物質

2.3.4.1 油脂

MVA 代謝路徑是合成 β -胡蘿蔔素主要路徑如圖 2-2，而在 MVA 代謝路徑中，足量的前體供應，是影響合成 β -胡蘿蔔素的關鍵，故許多文獻中皆有針對 MVA 代謝路徑的中間物來操作藉此來增加 β -胡蘿蔔素，例如：藉由過量的酶 HMG1(Rene Verwaal et al., 2007)及增加 ATP 及 NADPH 供應(Jing Zhao et al., 2013)，以及減少 ERG9 來限制麥角甾醇累積促使 FPP 進入 β -胡蘿蔔素的合成路徑(Hiroshi Shimada et al., 1998)。

而油類中含有飽和脂肪酸及不飽和脂肪酸供菌體利用來產生 Acetyl CoA，藉此進入 MVA 代謝路徑來合成 β -胡蘿蔔素，而文獻指出藉由添加額外的不飽和脂肪酸不僅恢復了細胞內的不飽和脂肪酸也提升了 130 % 的 β -胡蘿蔔素整體產量(Yuxia Sun et al., 2016)。

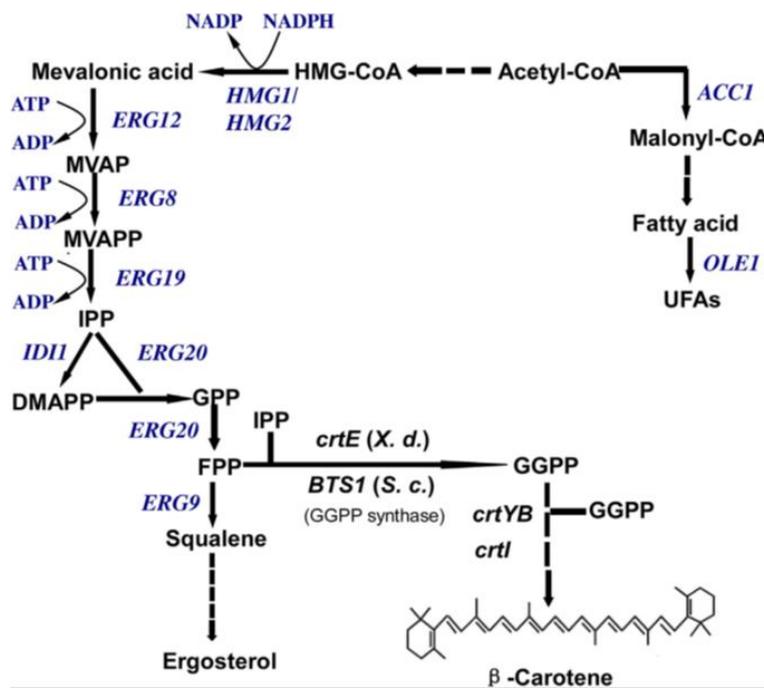


圖 2-2 β -胡蘿蔔素代謝路徑

2.3.4.2 軟棕櫚油

棕櫚油(Palm oil)是從油棕樹上的棕果(*Elaeis Guineensis*)中榨取出來的，主要來源是非洲油料棕櫚，它原產於熱帶非洲，亦產於中美洲、馬來西亞、印度尼西亞等地。其主要產地為馬來西亞，該國棕櫚油的產量佔世界產量的 60 % (Mba et al., 2015)。棕櫚果由外果皮、中果皮(成熟的中果皮又稱果肉)、內果皮和果核仁組成。由果肉壓榨出來的油稱棕櫚油(Palm oil)，由果核仁壓榨出來的油稱棕櫚仁(核)油(Palm Kernel oil)。兩種油的成分大不相同，棕櫚油主要含有棕櫚酸(C 16)和油酸(C 18)兩種最普通的脂肪酸，其飽和程度約為 50 %;棕櫚仁油主要含有月桂酸(C 12)，其飽和程度達 80 % 以上。而棕櫚油在外觀上是一種色澤常呈發紅的黃色油脂 (Edem, 2002)。

而硬棕櫚油及軟棕櫚油，是以不同的加工程度來區分。精緻棕櫚油經過了不同溫度控制的分餾處理後才區分為精緻軟棕(RBD palm oil stearin)及精緻硬棕(RBD palm stearin)，兩者最大差別在熔點的不同以及油酸含量的不同(馬來西亞棕櫚油局)。

2.3.5 固態發酵

固態發酵是利用一些固態之營養物質，在較乾燥之環境下培養微生物，而微生物再利用固態營養基質時，會以自然攀附或穿透固態基質等方式生長，形成一特殊生長型態，此種生長型態對某些微生物之二次代謝產物生產是極為重要(Viniegra-Gonzalez et al., 2003)。

2.3.5.1 固態發酵與液態發酵之差異

固態發酵與液態深層發酵主要的不同點如下(Sato and Sudo, 1999):

- (1) 固態發酵，微生物分布在固體表面，微生物生長與產物生成也主要在表面進行。基質不易攪拌均勻，因此培養環境為不均勻的。
- (2) 固態基質的水分含量一般都非常低，必須依基質的物理性質與化學性質而定。對於高水分含量的培養基而言，要穩定通氣通過基質床很困難，通常會發生渠道效應。
- (3) 由於菌體的新陳代謝與生長產生熱，提高了基質的溫度，造成水分的流失。此現象使得固態發酵的控制更具挑戰性。
- (4) 固態發酵的基質通常是天然物質，如：穀類、大豆、農業的生物量、固體廢棄物等。有時產物是整個發酵基質，如傳統性食品:miso、natto、tempeh。
- (5) 一般使用在固態發酵的微生物為黴菌，固態發酵中，黴菌的菌絲型態與液態深層發酵之菌絲型態不同。這兩種菌絲有不同的生理活性、複雜的控制過程。
- (6) 對基質床進行攪拌非常困難，某些產物的活性對剪應力非常敏感，所以培養一般是靜態的，除了轉鼓反應器與流體化床發酵槽。

2.3.5.2 固態發酵之優缺點

➤ 固態發酵的優點:

- (1) 因為細菌的生長受到低水活性的限制，因此固態發酵不易受到感染。
- (2) 如果產物必須從固態發酵中萃取，只需要較少的溶劑與較低的回收成本。
- (3) 原料取得、轉化發酵以及產品利用可以合而為一，通常可整個培養基都被利用，簡化下游的回收純化過程，減少廢棄物問題。例如納豆、飼料...等 (Mitchell and Lonsane, 1992)。
- (4) 微生物利用空氣中的氧氣，降低了通氣的能量成本。空氣的供給與基質床的溫度可藉由強制通氣來控制。
- (5) 固態基質的表面積大，促進熱傳送與氧氣和二氧化碳的氣體交換。

➤ 固態發酵的缺點:

- (1) 固態基質床的攪拌非常困難，造成基質床異質性的生理、物理、化學環境不均勻。因此細胞、養分、溫度、水含量分布不規則，這個複雜性使得控制過程非常困難。
- (2) 微生物呼吸或代謝產生熱使得溫度控制非常困難。因為固態基質床的熱傳導係數非常低。通常強制通氣是控制培養溫度的唯一方法。
- (3) 菌體生長與其它發酵參數的快速測量非常困難，尚無有用的感測器可供直接測量。
- (4) 微生物被限制在低水含量的基質上生長，黴菌或其他菌絲真菌最適合，細菌則不適合生長。
- (5) 固態發酵培養過程中，微生物生長速率往往低於液態發酵，整體所需培養時間較長，期間遭受雜菌污染的機率也較大 (羅與余,2004)

2.3.5.3 固態發酵之應用

在農業應用方面，可利用豬糞和稻草為基質，接種高溫放線菌進行固態發酵來製作堆肥製品(詹等, 1998;楊和陳, 2000)。或利用蔗渣作為基質，來生產單細胞蛋白質(SCP)及蛋白質強化飼料之生產。另外也可以利用含豐富澱粉類之農產品廢棄物如甘藷等作為基質，接種入具分解澱粉力之酵母菌如 *Saccharomyces sp.*、*Pichia burtonii* 和 *Schwanniomyces castellii* 等菌株進行固態發酵來進行蛋白質之強化(Yang, 1988)。在纖維質農產品及其廢棄物利用方面，以甜菜渣為基質接種 *Trichoderma album*，可提升基質之蛋白質含量由 6 % 提升至 21.5 %，或接種 *Streptomyces viridifaciens* 於甘藷渣上，進行四環黴素之生產以及接種 *S.rimosus* 生產地靈黴素(Yang and Yuan, 1990)。故經由固態發酵進行生質能轉換可使此類之農業廢棄物提升其再利用價值。

2.3.5.4 固態發酵培養重要參數

(1) 水分含量、濕度(moisture)

在真菌和細菌的固態發酵系統中，高含水量的效應使得多孔性下降、培養基顆粒結構瓦解、黏性增加、氣體體積減少、使得氣體交換也降低、氧氣傳輸降低使得氣生菌絲的形成增加。而太低的含水量卻造成固態培養基中營養物的溶解度降低、膨脹效果變差和增加水的張力 (Ramesh and Lonsane, 1990)。最適水分的選擇取決於微生物與基質本身。對一般真菌而言，最適水分介於 40 % 與 80 % 之間。對於相同微生物而言，生長在不同基質，其最適水分含量也會明顯不同。

濕度會影響到水的活性，文獻指出水活性對微生物生長及代謝息息相關 (Pastrana, 1996)，菌體生長與產物生成兩種適用的水活性會不同，最適水活性會依攪拌速率與培養溫度而不同。此外，發酵過程中，產物生成與基質水解皆會導致水活性改變。而濕度較高的情況下是比較適合酵母生長及生產 β -胡蘿蔔素的 (Ayerim Hernández-Almanza et al., 2014)。發酵過程中常利用通入潮濕的空氣或間歇性的噴灑水來控制水活性，而通入飽和氣體通常被使用來增加基質的水含量。通入氣體的相對濕度通常為 60 %~80 %。理想上，為了避免基質流失或增加水分，必須將通入的氣體與基質的水活性一致。實際上，發酵會產生水分，為了達到蒸發冷卻，通入的氣體必須稍微乾於基質。(賀士紅, 2000)(Shuler and Kargi, 1992)(Chisti, 1999)。

(2) 溫度 (Temperature)

固態發酵最大菌體濃度比典型的液態發酵(40-50 kg/m³)還低，但因為固態發酵只有少許的水能吸收熱量，所以每單位質量發酵物所產生熱量會使溫度快速上升，導致大規模發酵的溫度會難以控制。因此代謝熱的移除有時變成最主要的限制，特別對於熱傳導困難的多孔性發酵物。而發酵過程的溫度控制方面，幾乎都

是藉由蒸發冷卻的方法，利用較乾的空氣通入來提供較好的冷卻效果，或者可藉由間歇性的噴灑冷卻水來控制溫度以及防止基質脫水。而對於大量堆積的基質而言，間歇性的攪拌也可幫助熱移除。故對於菌體培養來說，溫度梯度問題的解決是必須的(Chisti, 1999)。

(3) pH

對於固態發酵而言，通常都沒有 pH 的控制。細菌耐酸鹼的能力較差故對於某些無菌過程，都將初始 pH 調到 4 或以下，可防止細菌汙染，而酵母菌與真菌通常可以忍受較酸的環境。發酵過程中 pH 皆會變化，對於固態發酵，大部分的基質都是很有效的緩衝劑，可防止發酵過程 pH 劇烈變化而影響菌體生長。發酵過程中保持 pH 穩定對某些發酵很重要，且酵素與某些二次代謝產物的穩定性也會受 pH 影響，即使產生速率不受 pH 影響，但因為產物不耐酸鹼而被破壞，導致總產率下降。以利用富含葡萄糖的糖莖甘蔗渣培養 *Aspergillus niger* 生產 pectinases，曾顯示類似的結果(Chisti, 1999)。

(4) 顆粒大小

通常顆粒較小的培養基會有較大的總表面積，能夠提升微生物與培養基接觸的機會，可是若基質顆粒過小，反而有可能會造成培養基形成團塊影響養分的傳遞，干擾氧氣的傳輸反不利於微生物生長。相反地，顆粒較大的培養基提供較佳的通氣環境（因增加顆粒間的空隙），但卻使微生物接觸培養基的機會受到表面積限制。因此適當大小的培養基顆粒是很重要的 (Pandey et al., 1999)。

2.3.6 玉米

玉米是一年生禾本科草本植物，是全世界總產量最高的重要糧食作物。因為玉米可以在各種不同的氣候下生長，因此被傳播到全地各地。

玉米的穀粒結構分為胚乳、胚芽、外皮及前蓋(tip cap)，外皮佔穀粒 5~6%，含有不溶性非澱粉質化合物，可供作飼料用；胚芽佔 10~14%，含有大量油脂，可當作玉米油原料；其餘八成為胚乳，主要成分為澱粉和蛋白質，玉米澱粉良率高低與直鏈澱粉和支鏈澱粉含量比例高低有關，而蛋白質僅占 9% 左右。玉米富含維生素（A、C）、礦物質（鈣、磷、鋅）、膳食纖維、核黃素、玉米黃質和亞油酸等營養成分：黃色玉米含有胡蘿蔔素、葉黃素等成分，但缺乏離氨酸（lysine）及色氨酸（tryptophan）。按照玉米粒的特性加以區分，玉米共有六種，包括凹玉米、甜玉米、莢玉米、硬玉米、粉玉米、及爆玉米等。

家禽飼糧的主要成分為蛋白質和能量，這兩項占總量的 90% 以上；因此，熱能飼料和蛋白質補充料，便成為家禽飼糧的主體。其次則為礦物質、維生素及飼料添加物等。玉米為雞的最主要熱能飼料，每公斤乾物質約含 3854 kcal 的代謝能(風乾物之 ME 為 3383 kcal/kg)。一般均先將玉米穀粒磨碎後，再餵飼雞隻。常用的黃色玉米雖然含較高的代謝能，但蛋白質品質欠佳，離氨酸(0.21%)和色氨酸(0.08%)含量偏低。飼料用玉米大都為黃色玉米，含有豐富的胡蘿蔔素。白色玉米缺乏胡蘿蔔素(Carotene)，其他養分的組成則類似黃色玉米。

第三章 實驗材料與方法

3.1 實驗材料

3.1.1 實驗酵母菌種及菌株

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。屬紅酵母菌之一，也屬於腐生菌的一類，在外觀上，細胞的型態呈卵圓形，菌落為紅色，如圖 3-1 所示。

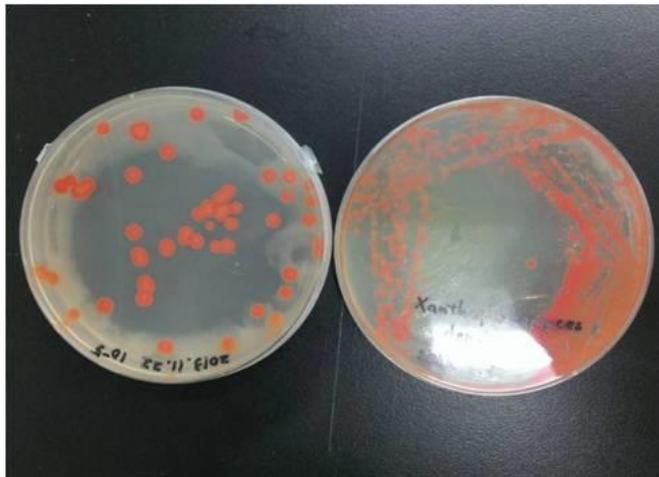


圖 3-1 黏紅酵母菌 *Rhodotorula glutinis* BCRC 22360 生長在 agar plate 上之外觀

3.1.2 實驗藥品

下表 3-1 為本實驗培養黏紅酵母菌使用之藥品清單。

表 3-1 黏紅酵母菌所使用之藥品清單

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

乙酸乙酯	Ethyl acetate	ECHO
異丙醇	Propan-2-ol	ECHO
氯仿	Chloroform	Seedchem
乙腈	Acetonitrile	ECHO
介面活性劑	Tween80	BBI
軟棕櫚油	Palm oil	順億化工有限公司
玄米油	Rice bran oil	Olitalia
大豆沙拉油	Soybean salad oil	台糖
橄欖油	Olive oil	Olitalia
葵花油	Sunflower oil	得意的一天
芥花油	Canola oil	泰山

3.2 實驗儀器

下表 3-2 為本實驗使用之實驗儀器清單

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	
5 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
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
鹵素杯燈	MR16-7W	
光度計	Lutron	LX-113S

3.3 分析方法

3.3.1 菌體濃度分析方法

取出 10 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、時間離心，去除上清液，取出下層菌體並利用紅外線水分蒸發儀，測得菌體乾重(Dry cell weight, DCW)。

3.3.2 甘油濃度分析方法

取 10 ml 發酵液，以轉速 7000 rpm 離心 10 min，取上清液並稀釋 10 倍，以 0.45 μm 針筒過濾器過濾。

利用 HPLC(Hitachi RI detector 5450, Hitachi pump 5110, Hitachi Auto Sampler 5210, Hitachi High-Technology Corporation, Japan) 分析甘油濃度，分析條件：管柱 C18 (Vercopak N50DS, 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 μL 。

3.3.3 總脂質濃度分析方法

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

3.3.4 β -胡蘿蔔素濃度分析方法

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 100-5C18 (Kromasil 100-5C18, 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。

3.4 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

3.4.2.2 發酵培養基 (Fermentation medium, FM)

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

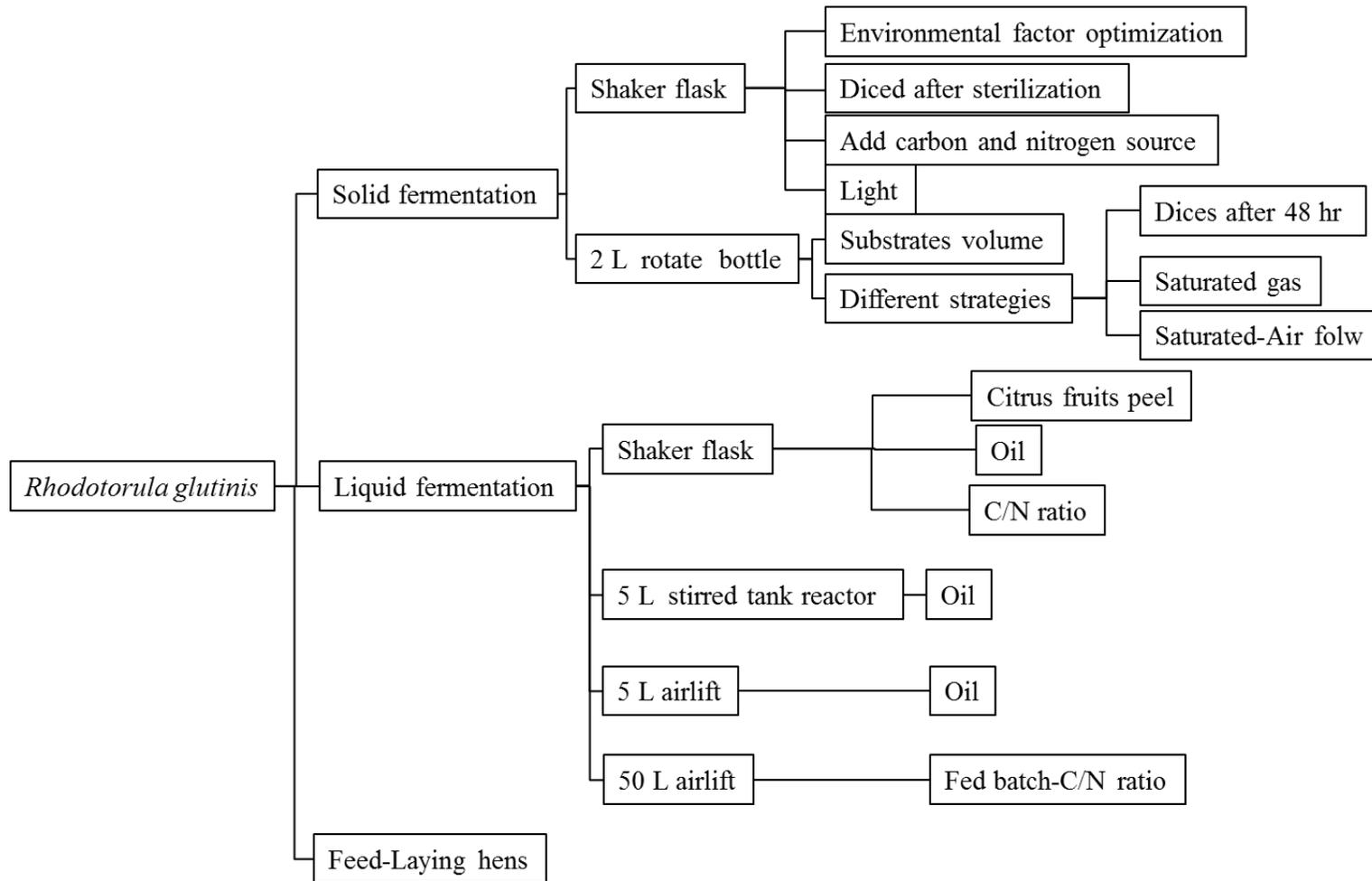
表 3-4 發酵培養基

Compounds	Concentration (g/L)
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

3.4.3 接菌

將培養 48 hr 之 Seed medium 接至 Fermentation medium 中，搖瓶、5 L airlift、5 L 攪拌式、50 L airlift 部分之接菌量為 Fermentation medium 10 %之體積。

3.5 實驗架構



3.6 實驗培養條件

3.6.1 固態搖瓶批次發酵程序

3.6.1.1 不同基質之影響

目的:探討不同基質下，對菌體生長、生成 β -胡蘿蔔素之影響

- (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 48 hr。
- (2) 分別秤取不同基質(黃豆、糙米、苦蕎麥、紅薏仁、玉米)10 g，並加以磨碎成粉，以逆滲透蒸餾水為溶劑，加入 50 ml 搖瓶中，固定整體含水量 70 % 配置成培養基
- (3) 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
- (4) 靜置於溫度 24 °C 培養箱中，培養 72 hr。

3.6.1.2 菌體培養時間之影響

目的:探討菌體生長隨著時間變化，找出最佳培養時間

- (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 48 hr。
- (2) 秤取玉米 10 g，並加以磨碎成粉，加入 50 ml 搖瓶中，以逆滲透蒸餾水為溶劑，固定整體含水量 70 % 配置成培養基
- (3) 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
- (4) 靜置於溫度 24 °C 培養箱中，改變培養時間(0、24、48、72、96、120 hr)。

3.6.1.3 不同含水量之影響

目的:探討固定基質為玉米，在不同含水量下菌體生長、 β -胡蘿蔔素生成之影響。

- (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 48 hr。
- (2) 秤取玉米 10 g，並加以磨碎成粉，加入 50 ml 搖瓶中，以逆滲透蒸餾水為溶劑，分別改變整體含水量(50、55、60、65、70%)配置成培養基。
- (3) 以 10% 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
- (4) 靜置於溫度 24 °C 培養箱中，培養 96 hr。

3.6.1.4 不同粒徑大小之影響

目的:探討改變玉米基質的粒徑大小對菌體生長、 β -胡蘿蔔素生成之影響。

- (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 48 hr。
- (2) 秤取玉米 10 g，並加以磨碎，利用不同孔徑(0.8、2 mm)之篩網，篩出不同粒徑的玉米，加入 50 ml 搖瓶中，以逆滲透蒸餾水為溶劑，固定含水量 65% 配置成培養基。
- (3) 以 10% 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
- (4) 靜置於溫度 24 °C 培養箱中，培養 96 hr。

3.6.1.5 滅菌過之基質進行切塊之影響

目的:探討藉由切塊來增加菌體生長面積以及接觸機會，對菌體生長及類胡蘿蔔素生成之影響。

- (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 48 hr。
- (2) 秤取玉米 10 g，並加以磨碎成粉，加入 50 ml 搖瓶中，以逆滲透蒸餾水為溶劑，固定整體含水量 65 % 配置成培養基。
- (3) 待上述培養基滅菌後，移到無菌操作台裡進行切塊程序，切塊大小保持一致。
- (4) 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
- (5) 靜置於溫度 24 °C 培養箱中，培養 96 hr。

3.6.1.6 添加碳氮源(蔗糖、硫酸銨)於基質中之影響

目的:探討於溶劑中加入碳源(蔗糖)及氮源(硫酸銨)，對菌體生長及 β -胡蘿蔔素生成之影響。

- (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 48 hr。
- (2) 秤取玉米 10 g，並加以磨碎成粉，加入 50 ml 搖瓶中，以逆滲透蒸餾水為溶劑，於溶劑中加入蔗糖及硫酸銨，添加量分別為 0.36 g 以及 0.09 g，固定含水量為 65 % 配置成培養基
- (3) 待上述培養基滅菌後，移到無菌操作台裡進行切塊程序，切塊大小保持一致。
- (4) 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。

(5) 靜置於溫度 24 °C 培養箱中，培養 96 hr。

I. 固定硫酸銨添加濃度改變蔗糖添加濃度之影響

目的:探討在氮源添加量固定下，不同碳源添加量對菌體生長及 β-胡蘿蔔素生成之影響。

- (1) *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
- (2) 秤取玉米 10 g，並加以磨碎成粉，加入 50 ml 搖瓶中，以逆滲透蒸餾水為溶劑，於溶劑中加入蔗糖及硫酸銨，硫酸銨添加量固定為 0.09 g，分別改變蔗糖添加量(0.09、0.18、0.36 g)，固定含水量為 65 % 配置成培養基。
- (3) 待上述培養基滅菌後，移到無菌操作台裡進行切塊程序，切塊大小保持一致。
- (4) 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
- (5) 靜置於溫度 24 °C 培養箱中，培養 96 hr。

II. 固定蔗糖添加濃度改變硫酸銨添加濃度之影響

目的:探討在蔗糖添加量固定下，不同硫酸銨添加量對菌體生長及 β-胡蘿蔔素生成之影響。

- (1) *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
- (2) 秤取玉米 10 g，並加以磨碎成粉，加入 50 ml 搖瓶中，以逆滲透蒸餾水為溶劑，於溶劑中加入蔗糖及硫酸銨，蔗糖添加量固定為 0.36 g，分別改變不同硫酸銨添加量(0.09、0.18、0.36 g)，固定含水量為 65 % 配置成培養基。

- (3) 待上述培養基滅菌後，移到無菌操作台裡進行切塊程序，切塊大小保持一致。
- (4) 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
- (5) 靜置於溫度 24 °C 培養箱中，培養 96 hr。

3.6.1.7 不同光照強度之影響

目的:探討光照強度對菌體生長及 β -胡蘿蔔素生成之影響。

- (1) *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
- (2) 秤取玉米 10 g，並加以磨碎成粉，加入 50 ml 搖瓶中，以逆滲透蒸餾水為溶劑，於溶劑中加入蔗糖及硫酸銨(0.36 g、0.09 g)，整體含水量為 65 % 配置成培養基。
- (3) 待上述培養基滅菌後，移到無菌操作台裡進行切塊程序，切塊大小保持一致。
- (4) 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
- (5) 靜置於溫度 24 °C 培養箱中，分別改變光照強度(0、4.8、103.7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)培養 96 hr。

3.6.2 2 L 旋轉瓶固態批次發酵程序

3.6.2.1 單瓶 2L 固態旋轉瓶填裝基質量之影響

目的:探討填裝基質量對菌體生長及 β -胡蘿蔔素生成之影響。

- (1) *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
- (2) 分別秤取玉米 100、200、400 g，並加以磨碎成粉，加入 2 L 旋轉瓶中，以逆滲透蒸餾水為溶劑，於溶劑中加入蔗糖及硫酸銨(3.6、0.9 g)，固定含水量為 65 % 配置成培養基。
- (3) 待上述培養基滅菌後，移到無菌操作台裡進行切塊程序，切塊大小保持一致。
- (4) 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中
- (5) 於溫度 24 °C 的室內中，通氣量為 2 L/min 培養 96 hr。

3.6.2.2 改變培養方式

➤ 於培養期間對基質進行磨碎

目的:探討改變基質型態對菌體生長及 β -胡蘿蔔素生成之影響

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 分別秤取玉米 100、200、400 g，並加以磨碎成粉，加入 2 L 旋轉瓶中，以逆滲透蒸餾水為溶劑，於溶劑中加入蔗糖及硫酸銨(3.6、0.9 g)，固定含水量為 65 % 配置成培養基。
3. 待上述培養基滅菌後，移到無菌操作台裡進行切塊程序，切塊大小保持一致。

4. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中
5. 靜置於溫度 24 °C 的室內中，通氣量為 2 L/min，培養至 48 hr 後移至無菌操作台中，利用磨碎機將發酵物加以磨碎，再繼續培養 48 hr。

➤ 改變通氣方式之影響

目的:探討通入不同濕度之氣體對菌體生長及 β-胡蘿蔔素生成之影響。

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 分別秤取玉米 100、200、400 g，並加以磨碎成粉，加入 2L 旋轉瓶中，以逆滲透蒸餾水為溶劑，於溶劑中加入蔗糖及硫酸銨(3.6、0.9 g)，固定含水量為 65 % 配置成培養基。
3. 待上述培養基滅菌後，移到無菌操作台裡進行切塊程序，切塊大小保持一致。
4. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中
5. 靜置於溫度 24 °C 的室內中，通氣量為 2 L/min，改變氣體通入瓶內的路徑，先將空氣導入水瓶中，使瓶內水達飽和後，再將飽和氣體通入 2 L 旋轉瓶中，培養至 96 hr

3.6.2.3 間歇性通入飽和氣體-進氣量之影響

目的: 探討不同進氣量對菌體生長及 β -胡蘿蔔素生成之影響。

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 分別秤取玉米 100、200、400 g，並加以磨碎成粉，加入 2L 旋轉瓶中，以逆滲透蒸餾水為溶劑，於溶劑中加入蔗糖及硫酸銨(3.6、0.9 g)，固定含水量為 65 % 配置成培養基。
3. 待上述培養基滅菌後，移到無菌操作台裡進行切塊程序，切塊大小保持一致。
4. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中
5. 靜置於溫度 24 °C 的室內中，通氣量為 2 L/min，改變氣體通入瓶內的路徑，先將空氣導入水瓶中，使瓶內水達飽和後，再將飽和氣體通入 2 L 旋轉瓶中，培養至 96 hr

3.6.3 深層液態搖瓶批次發酵程序

3.6.3.1 添加柑橘類果皮萃取液之影響

目的:探討添加柑橘類果皮萃取液對菌體生長及 β -胡蘿蔔素生成之影響。

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透蒸餾水為溶劑，依照表 3-4 配置 50 ml 培養基
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於溫度 24 °C 培養箱中，轉速 150 rpm，分別於培養初期(0 hr)以及培養期間(24、48 hr)添加柑橘類果皮萃取液 2 ml，總培養時間為 96 hr。

3.6.3.2 添加植物油之影響

I. 不同植物油之影響

目的:添加油脂探討脂肪酸對菌體生長及 β -胡蘿蔔素生成之影響。

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透蒸餾水為溶劑，依照表 3-4 配置 50 ml 培養基，並分別在培養基中添加 6 種植物油(軟棕櫚油、大豆沙拉油、玄米油、橄欖油、芥花油、葵花油)，添加濃度為 10 %。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於溫度 24 °C 培養箱中，轉速 150 rpm，培養 96 hr。

II. 添加不同濃度軟棕櫚油之影響

目的:探討不同濃度下的軟棕櫚油對菌體生長及 β -胡蘿蔔素生成之影響。

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透蒸餾水為溶劑，依照表 3-4 配置 50 ml 培養基，並分別在培養基中添加不同濃度的軟棕櫚油(0.5、1、2.5、5、10、15%)。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於溫度 24 °C 培養箱中，轉速 150 rpm，培養 96 hr。

3.6.3.3 不同 C/N ratio 之影響

目的:探討不同程度之 C/N ratio 對於菌體生長及 β -胡蘿蔔素生成之影響。

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透蒸餾水為溶劑，依照表 3-4 僅改變碳源濃度(30、60、120 g/L)配置 50 ml 不同 C/N ratio 培養基。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 於溫度 24 °C 培養箱中，轉速 150 rpm，培養 96 hr。

3.6.4 5 L 攪拌式發酵槽批次發酵程序

3.6.4.1 添加 2.5 % 軟棕櫚油、1 g/L Tween 80 之影響

目的:探討 2.5 % 軟棕櫚油、1 g/L Tween 80 添加放大至 5 L 攪拌式發酵槽，對於菌體生長及 β -胡蘿蔔素生成之影響。

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透蒸餾水為溶劑，依照表 3-4 配置並在其中添加 2.5 % 的軟棕櫚油配置成 3000 ml 培養基。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 每 15 hr 以及 9 hr 取樣。

3.6.5 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序

3.6.5.1 添加 2.5 % 軟棕櫚油、1 g/L Tween 80 之影響

目的: 探討 2.5 % 軟棕櫚油、1 g/L Tween 80 添加放大至 5 L 氣舉式發酵槽，對於菌體生長及 β -胡蘿蔔素生成之影響

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透蒸餾水為溶劑，依照表 3-4 配置並在其中添加 2.5 % 的軟棕櫚油配置成 5000 ml 培養基
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 每 15 hr 以及 9 hr 取樣。

3.6.6 50 L 氣舉式發酵槽發酵程序

3.6.6.1 Fed-batch- C/N ratio 之影響

➤ 低 C/N ratio 之影響

目的:探討利用 Fed-batch 饋料方式改變培養基的 C/N ratio 對於菌體生長及 β -胡蘿蔔素生成之影響。

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透蒸餾水為溶劑，依照表 3-4 配置 40 L 培養基，其中粗甘油濃度改為 120 g/L。
3. 以 1 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 每 15 hr 以及 9 hr 取樣。
5. 於培養中期饋料碳源(粗甘油 60 g/L)氮源(硫酸銨 1g/L、Yeast extract 1 g/L)。

➤ 高 C/N ratio 之影響

1. *R. gutinis* 接種於 50 ml SM 培養基，於轉速 150 rpm、溫度 24 °C 培養箱中，培養 48 hr。
2. 以逆滲透蒸餾水為溶劑，依照表配置 40 L 培養基，其中粗甘油濃度改為 120 g/L。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述之培養基中。
4. 每 15 hr 以及 9 hr 取樣。
5. 於培養中期饋料碳源(粗甘油 60 g/L)。

3.7 實驗裝置圖

本實驗所使用的培養裝置，包括搖瓶、5 L 攪拌式發酵槽、5 L 氣舉式發酵槽 50 L 氣舉式發酵槽以及固態旋轉發酵槽。

3.7.1 搖瓶發酵培養裝置圖 (250 ml)

本實驗所使用 250 ml shaker flask，實際工作體積 50 ml。



圖 3-2 搖瓶實驗裝置圖

3.7.2 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵培養裝置圖

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

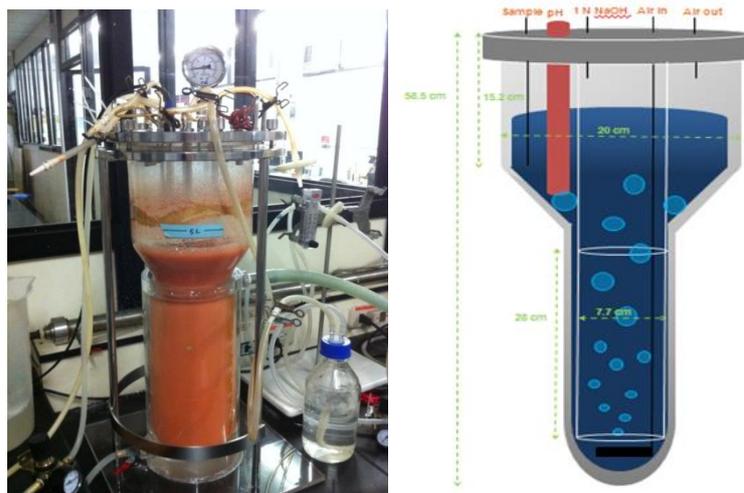


圖 3-3 5 L 氣舉式發酵槽裝置實圖(左)、示意圖(右)

3.7.3 5 L 攪拌式發酵槽批次發酵培養裝置圖

本實驗所使用 5 L 攪拌式發酵槽，槽體高 34.8 cm；槽體外徑長 23.4 cm；槽體內徑長 16.9 cm；攪拌葉片直徑 8.5 cm，實際發酵體積 3 L。



圖 3-4 5 L 攪拌式發酵槽裝置圖

3.7.4 50 L 氣舉式發酵槽饋料批次培養裝置圖

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



圖 3-5 50 L 氣舉式發酵槽裝置圖

3.7.5 固態旋轉發酵槽培養裝置圖

本實驗使用之 2 L 固態旋轉瓶，瓶底內徑 11.5 cm；瓶口內徑 6.5 cm；瓶高 25 cm；擋板高 1 cm；擋板長 14 cm。

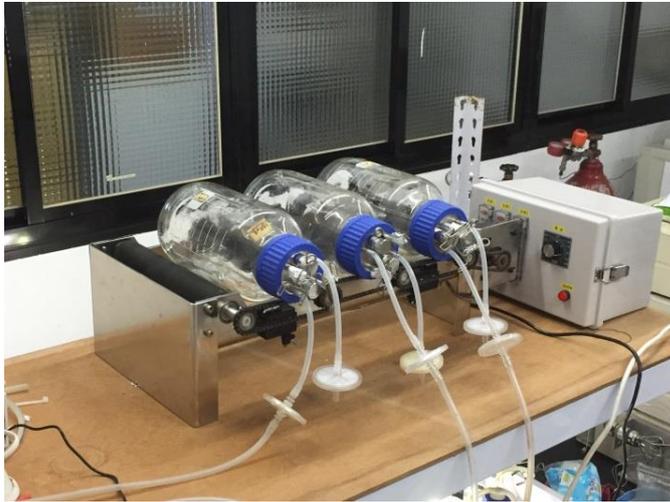


圖 3-6 固態旋轉發酵槽裝置圖

第四章 結果與討論

4.1 固態搖瓶批次發酵程序

本次選用的菌種 *R. glutinis*，此菌種一直以來被廣泛用於液態深層發酵，在脂質以及 β -胡蘿蔔素方面皆有不錯的表現，由於本實驗目的在於 β -胡蘿蔔素的提升，而 β -胡蘿蔔素屬於次級代謝物，文獻指出固態發酵程序的生長型態對某些微生物的次級代謝物生產是有正面幫助的，並且在後續發酵物的處理上面，固態發酵物通常可以直接被利用，簡化下游的回收純化過程，並減少廢棄物問題。(Ayerim Hernandez-Almanza 2014)因此本實驗將探討利用固態發酵培養 *R. glutinis* 對於 β -胡蘿蔔素的影響。

4.1.1 不同基質之影響

本實驗選用了七種市面上容易取得的農產品，分別為黃豆、糙米、苦蕎麥、紅薏仁、玉米、紅豆、綠豆，分別磨成粉末，秤取 10 g 基質，固定含水量為 70%，培養 72 hr，實驗結果如圖 4-1，使用玉米作為基質效果較好可得 β -胡蘿蔔素 2.46 mg/kg 發酵物，其次為苦蕎麥以及黃豆，各基質發酵培養的情形如圖 4-2、4-3、4-4，因基質本身即含有 β -胡蘿蔔素，因此分別對純基質所含之 β -胡蘿蔔素做了分析如圖 4-5，培養前後比對之結果如表 4-1，仍以玉米作為基質效果較好，可產出 1.69 mg/kg 發酵物的 β -胡蘿蔔素。故接下來皆以玉米作為基質做後續實驗。

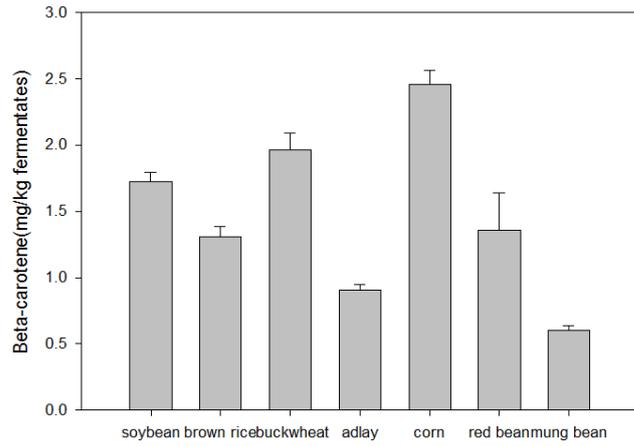


圖 4-1 不同基質對於 *R. glutinis* 生產 β -胡蘿蔔素之影響



圖 4-2 黃豆(左)、糙米(中)、苦蕎麥(右)培養情形

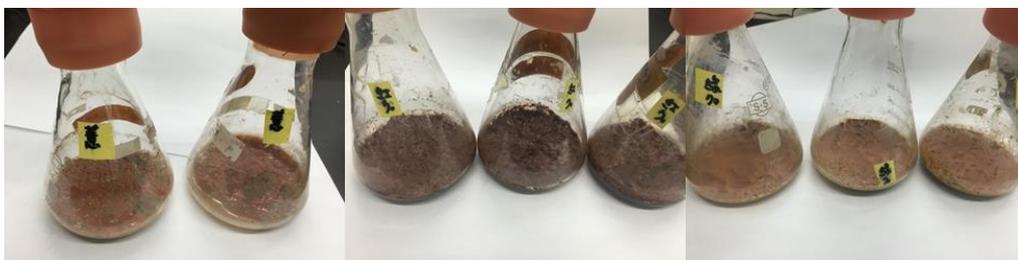


圖 4-3 紅薏仁(左)、紅豆(中)、綠豆(右)培養情形

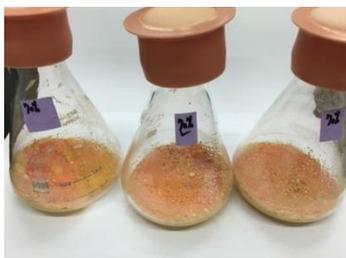


圖 4-4 玉米培養情形

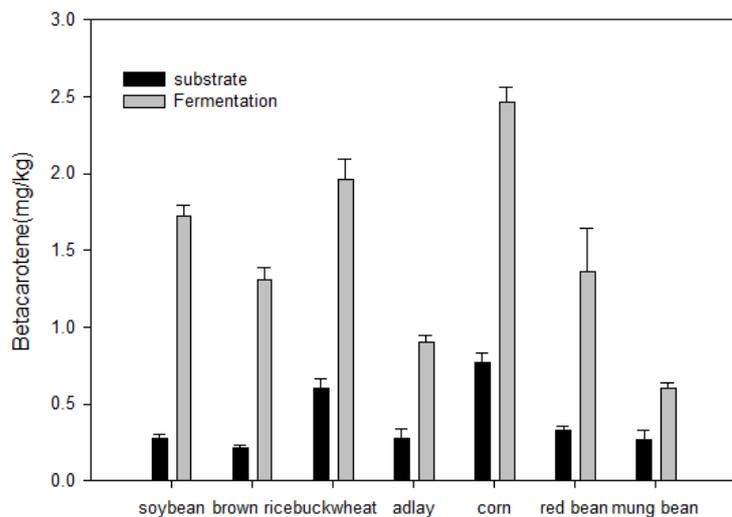


圖 4-5 不同基質本身 v.s 發酵培養物之 β -胡蘿蔔素濃度

表 4-1 各基質培養前後，提升之 β -胡蘿蔔素總量

基質	提升之 β -胡蘿蔔素 (mg/kg 發酵物)
黃豆粉	1.445±0.047
糙米粉	1.091±0.045
苦蕎麥粉	1.361±0.092
紅薏仁粉	0.629±0.051
玉米粉	1.695±0.083
紅豆粉	1.030±0.150
綠豆粉	0.338±0.048

4.1.2 菌體培養時間之影響

本實驗探討 *R. glutinis* 在不同時間下其 β -胡蘿蔔素累積情形，使用藉此希望減少實驗的 Time course，實驗結果如圖 4-6，*R. glutinis* 在 48 hr 前，其 β -胡蘿蔔素提升幅度並不明顯，於 24 hr 時 β -胡蘿蔔素為 0.779 mg/kg 發酵物對比圖 4-5，並還沒開始累積 β -胡蘿蔔素，而 β -胡蘿蔔素在 48 hr 後開始快速提升，此現象與 *R. glutinis* 在液態深層培養中的情形相符合，在 48 hr 前菌體應處於對數生長期，菌體在這段期間開始快速生長，過了 48 hr 後菌體轉而開始累積次級代謝物 β -胡蘿蔔素，到了 96 hr 後累積速率開始呈現持平的情況， β -胡蘿蔔素濃度達到 2.442 mg/kg 發酵物，由此得知 *R. glutinis* 培養時間以 96 hr 較為合適。

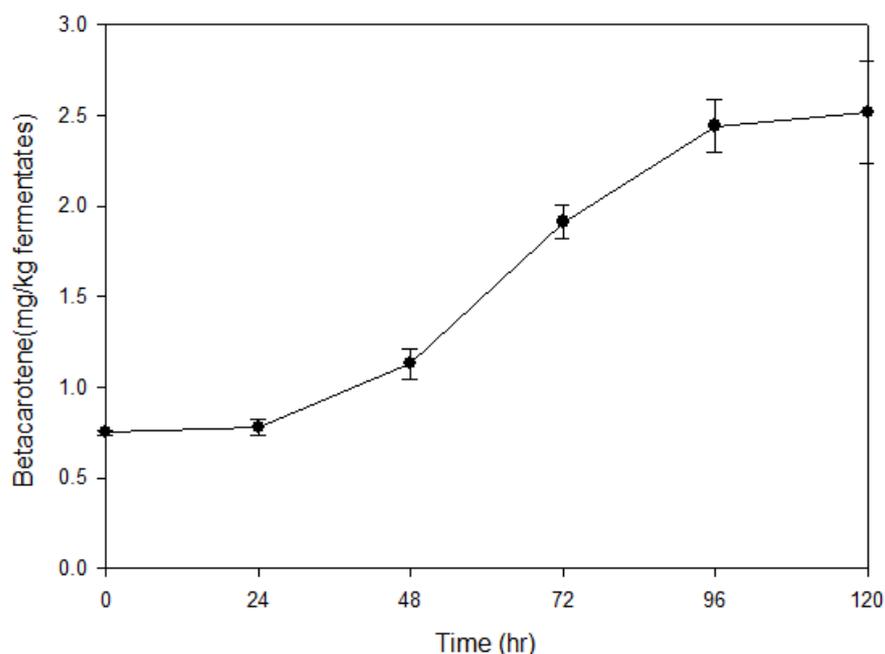


圖 4-6 *R. glutinis* 生成 β -胡蘿蔔素之時間變化量

4.1.3 不同含水量之影響

實驗選用玉米作為基質， $\left(\frac{x}{x+\text{基質重}}\right) * 100\% = \text{含水量}\%$ (x 為所添加之水量)，改變含水量為 50、55、60、65、70%，實驗結果如圖 4-7，隨著含水量提高，其培養效果愈佳，在含水量低於 55% 時，菌體幾乎無法生長，所測得的 β -胡蘿蔔素對比圖 4-2 幾乎等於玉米本身含有之 β -胡蘿蔔素，可見 *R. glutinis* 並無法在低水量環境下生存。而當含水量提高至 65% 時，所得的 β -胡蘿蔔素提升幅度開始趨緩，應是實驗處於靜置，水分含量太高導致氧氣傳遞能力降低，而使菌體生長開始受到限制。(Ramesh et al., 1990) 而在設計實驗時也發現含水量在 70% 時，基質在滅菌完成後表面已經十分潮濕，再將含水量往上提高，則發現基質表面累積一定的水量，故認為含水量 70% 已是本實驗所能接受之最高值。

然而考量到之後放大培養的實驗，曾試過以 70% 的含水量培養在 2 L 的固態旋轉瓶中，發現基質表面累積一定水量，因此後續實驗皆固定含水量為 65%，其 β -胡蘿蔔素可得 2.16 mg/kg 發酵物。

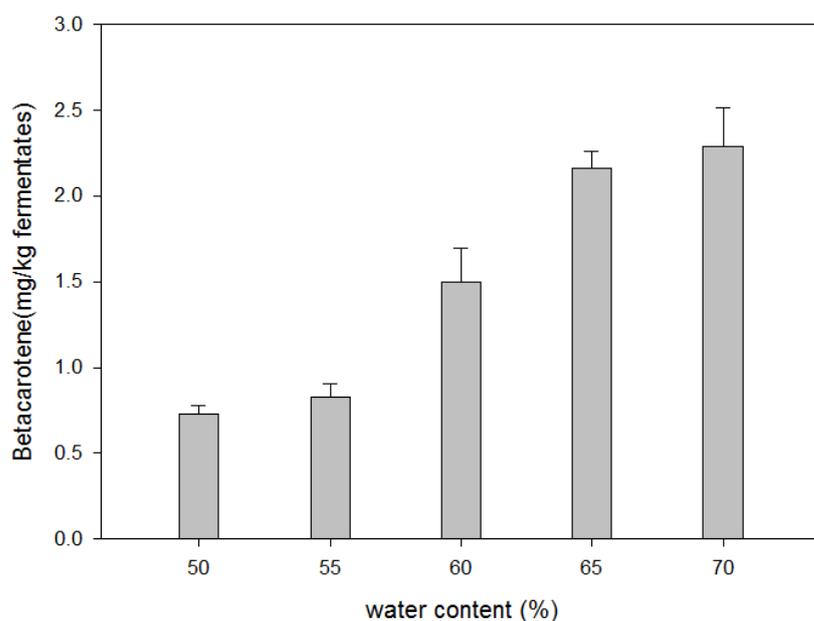


圖 4-7 不同含水量對於 *R. glutinis* 生產 β -胡蘿蔔素之影響

4.1.4 不同粒徑大小之影響

本實驗將玉米粒打碎藉由不同孔徑(0.85、2 mm)的篩網將其分成大(大於 2 mm)、中(介於 0.85、2 mm)、小(小於 0.85 mm)三種粒徑，由於玉米粒本身外殼十分堅硬，菌體較難消化分解，因此其打碎程度會影響玉米養分被分解吸收以及菌體生長面積，由圖 4-8 可發現粒徑小的效果較佳， β -胡蘿蔔素為 2.449 mg/kg 發酵物，其次為粒徑大的， β -胡蘿蔔素為 1.473 mg/kg 發酵物，而粒徑中等的， β -胡蘿蔔素為 1.077 mg/kg 發酵物，可見玉米粒本身並無法直接被菌體吸收，必須藉由外力將玉米堅硬的殼破壞，使菌體較能消化分解並依附其生長。

菌體在不同粒徑下的生長情形如圖 4-9、4-10、4-11，可發現粒徑小之菌體可分布於整個表面，但由於粒徑小，導致基質過於緊密，因此菌體無法向下生長於基質另一面；而粒徑中等的，菌體雖有生長，由於玉米粒還有部分外殼沒被破壞並散佈於表面，阻擋菌體向四周攀附，因此菌體只有散狀分布於表面，基質另一面也因為過於緊密導致只有微量菌體生長；而粒徑大的，雖然堅硬外殼被破壞的程度最小，菌體只能少量分布在玉米粒被破壞的缺口上，但由於粒徑大，導致基質較為鬆散，故菌體有了向下發展的趨勢，在基質另一面有較多的菌體分布，因此粒徑最大的 β -胡蘿蔔素濃度反而高於粒徑中的。

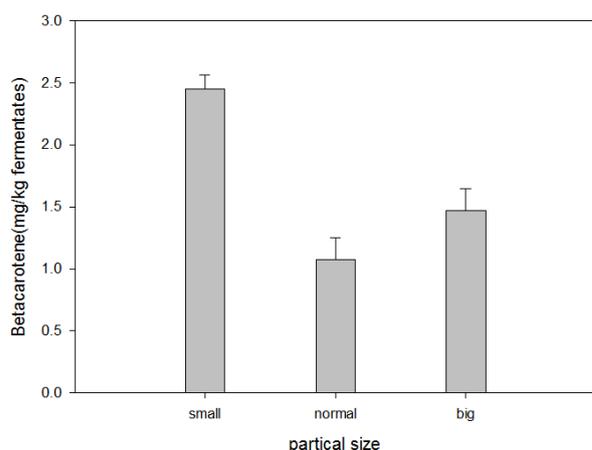


圖 4-8 不同粒徑大小對 *R. glutinis* 生成 β -胡蘿蔔素之影響



圖 4-9 粒徑小的(*less than 0.85 mm*)生長情形



圖 4-10 粒徑中的(*between 0.85 mm and 2 mm*)生長情形



圖 4-11 粒徑大的(*larger than 2 mm*)生長情形

4.1.5 滅菌過之基質進行切塊之影響

在不同粒徑大小的實驗中可發現，雖然粒徑小的可讓菌體分布於整個表面，但也因為基質粒徑過小，導致基質過於緊密，浪費了基質表面以外的部分，限制了菌體生長的空間，為了使基質層其他部分可被菌體所利用，本實驗藉由將滅菌過後的基質在無菌的操作台中進行切塊，切塊示意圖如圖 4-12，而為了使切塊後的基質接觸到菌體的機率提高，故採取每 12 hr 人工進行搖晃的動作。

實驗結果圖 4-13，經由切塊的動作所得 β -胡蘿蔔素濃度相比於不切塊，提高了 1.2 倍，可達到 2.963 mg/kg 發酵物。



圖 4-12 基質滅菌後切塊示意圖

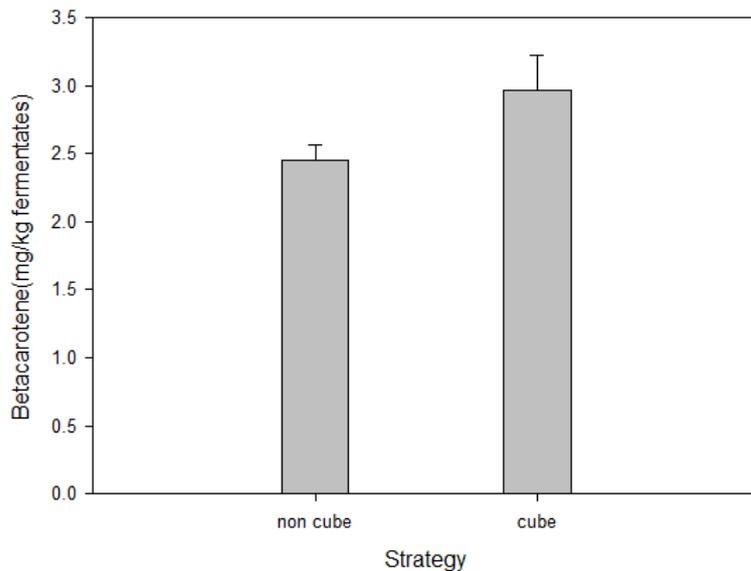


圖 4-13 滅菌過基質切塊之影響

4.1.6 添加碳氮源(蔗糖、硫酸銨)於基質中之影響

許多研究得知 C/N ratio 高低對生物體合成類胡蘿蔔素有顯著的效果(Vustin et al., 2004)，在合成類胡蘿蔔素方面有研究指出 C/N ratio 低時細胞生長雖有較好的表現，但在類胡蘿蔔素方面表現則相對較差，相反地，在 C/N ratio 高時細胞生長卻會受到高濃度碳源所抑制，而類胡蘿蔔素濃度則提高(YU-ICHI YAMANE et al., 1997)。雖然基質本身即是營養源，但或許對於供給菌體生長仍稍嫌不足，故本實驗選用蔗糖及硫酸銨作為額外添加的碳氮源，來提供菌體更優渥的生長環境，而不同微生物其適合生長的 C/N ratio 也不盡相同，故找出較好的添加比例，使 β -胡蘿蔔素得到提升，也是首要關鍵。

I. 固定硫酸銨添加濃度改變蔗糖添加濃度之影響

本實驗固定硫酸銨添加量為 0.09 g，分別改變蔗糖添加量為 0.09、0.18、0.36 g，實驗結果如圖 4-14，以蔗糖添加量 0.36 g 效果較好， β -胡蘿蔔素可得 4.272 mg/kg 發酵物，相對於控制組的 2.754 mg/kg 發酵物，提高了約 1.5 倍，再來依序是 0.18、0.36 g 的蔗糖添加量， β -胡蘿蔔素的濃度隨著蔗糖添加量下降而遞減，此結果與文獻指出在 C/N 高時有利於 β -胡蘿蔔素合成相符。

II. 固定蔗糖添加濃度改變硫酸銨添加濃度之影響

本實驗固定蔗糖添加量為 0.36 g，分別改變硫酸銨添加量為 0.09、0.18、0.36 g，實驗結果如圖 4-15，由結果可發現硫酸銨添加量為 0.08 g 效果較好， β -胡蘿蔔素濃度達到 3.669 mg/kg 發酵物，相對於控制組的 2.423 mg/kg 發酵物，提高了約 1.5 倍，再來依序是 0.16、0.32 g 的硫酸銨濃度添加，隨著硫酸銨濃度提高，抑制了菌體合成 β -胡蘿蔔素，故選用蔗糖 0.36 g、硫酸銨 0.08 g 的條件做後續實驗。

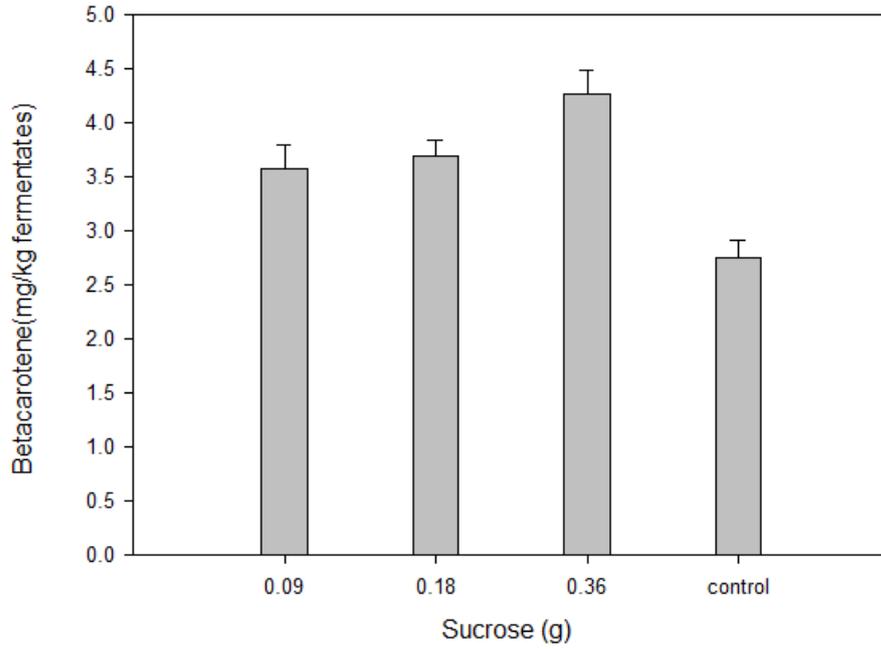


圖 4-14 固定硫酸銨添加量 0.09 g 改變蔗糖添加量(0.09、0.18、0.36 g)之影響

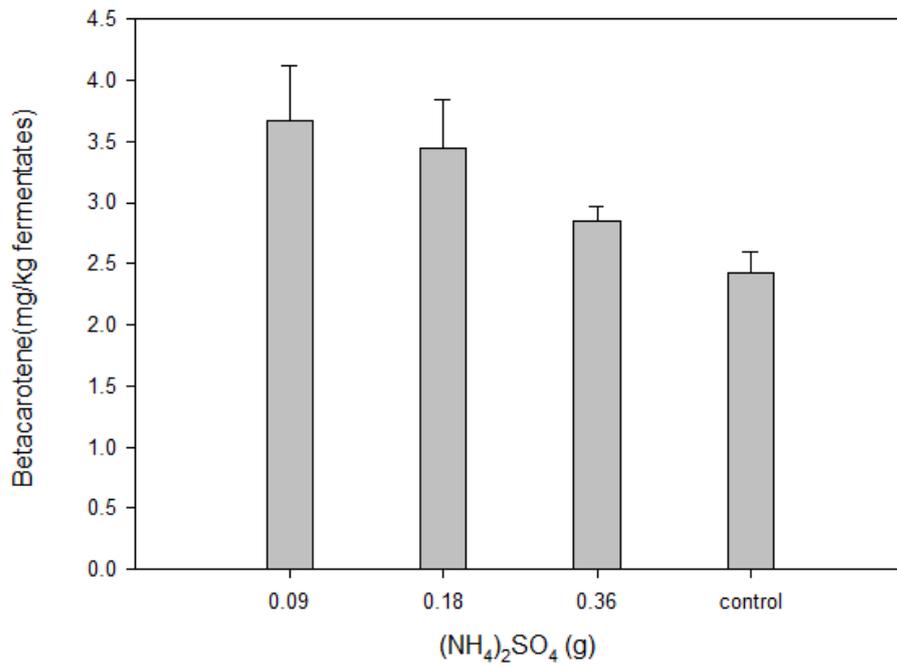


圖 4-15 固定蔗糖添加量 0.36 g 改變硫酸銨添加量(0.09、0.18、0.36 g)之影響

4.1.7 不同光照強度之影響

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)，並且文獻(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，進而影響菌體的生長與代謝產物的生成，因此，本次實驗將探討不照光($0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、日光燈($4.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 以及鹵素燈($103.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)對於 *R. glutinis* 生長及 β -胡蘿蔔素生產之影響，實驗結果如圖 4-16，由結果來說，光照強度的提高，對於 *R. glutinis* 在固態發酵中生產 β -胡蘿蔔素來說並沒有明顯的影響。

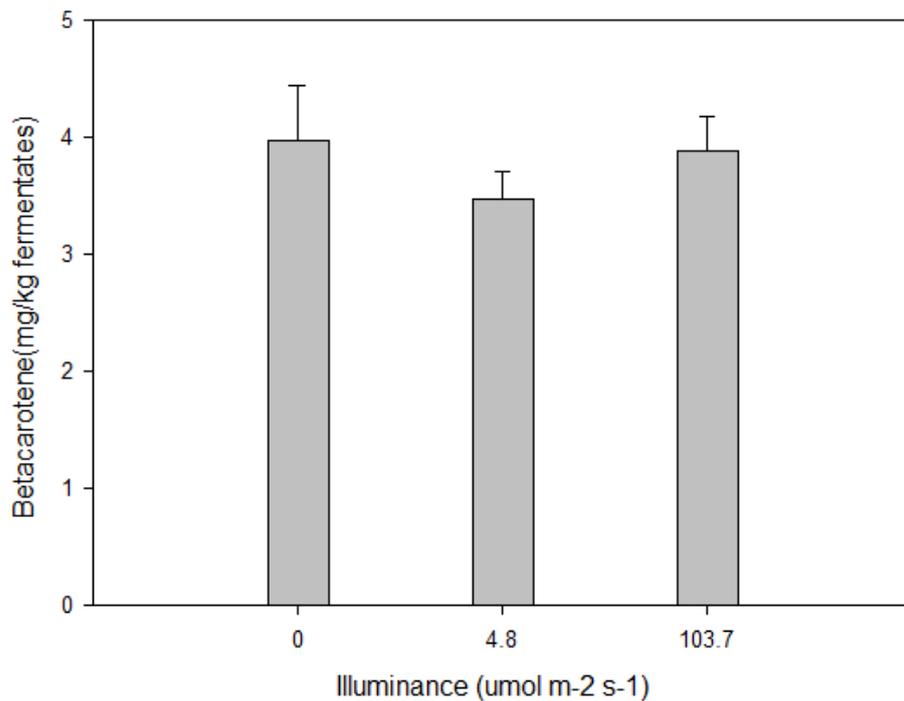


圖 4-16 不同光照度對 *R. glutinis* 生產 β -胡蘿蔔素之影響

4.2 2 L 旋轉瓶固態批次發酵程序

對於固態發酵來說，通常是採用靜置的培養方式，而此方式有兩個較大缺點，第一，菌體通常只能生長在基質表面，只有少部分的菌種有能力穿透基質床進行生長，導致菌體的生長面積受到限制，並且此培養方式如須放大培養，必定需要極大的容器，因此適當容器的選擇又會是另一個難題，相對應的其所需之成本也大大提升，故此培養方式是相當不利的；第二個缺點在於難以對基質床進行攪拌，因此基質有很大部分皆沒有被菌體所利用。

故本實驗選擇 2 L 旋轉瓶，利用反應器加以控制來回轉動，並且在瓶中有加裝擋板，藉此可加強轉動時基質攪拌的程度。

4.2.1 單瓶 2 L 固態旋轉瓶填裝基質量之影響

為了更有效利用發酵瓶體積以及提高效益，分別測試了添加 100、200、400 g 基質量於 2 L 發酵瓶中，實驗結果如圖 4-17，可發現 100 g 及 200 g 的基質量對於菌體來說，在 β -胡蘿蔔素表現方面差異並不大皆可得到約 4.2 mg/kg 發酵物的 β -胡蘿蔔素，提高至 400g 時明顯下降，得到 2.7 mg/kg 發酵物，由於基質過於壅擠導致滾動效果變差，並且固態旋轉瓶是由瓶蓋上方進行通氣，因此太過擁擠導致通氣效果變差，故認為在單瓶中添加 200 g 的基質量進行培養是較為合適的。

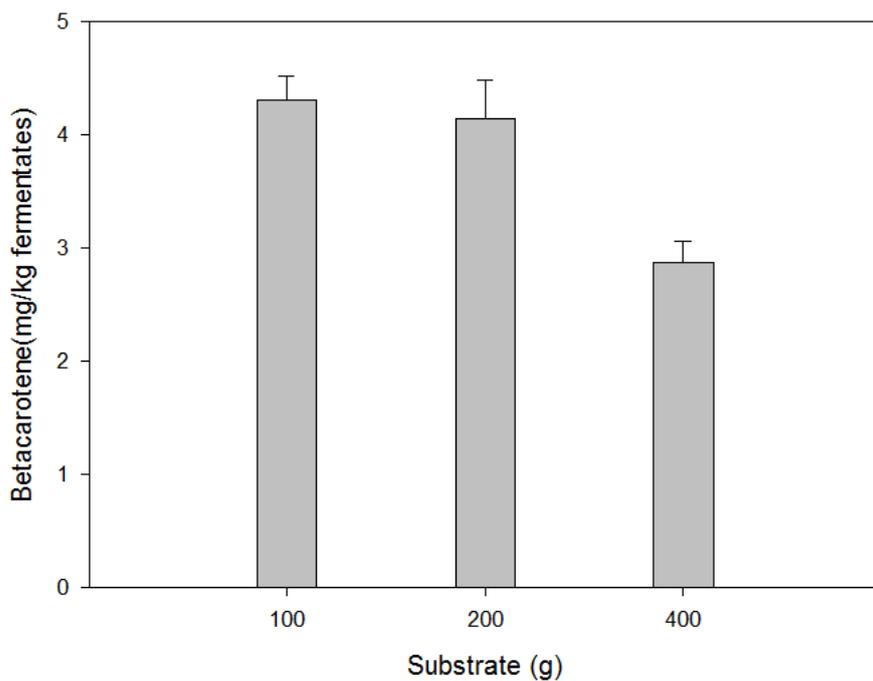


圖 4-17 改變單瓶固態旋轉瓶之基質量對 *R. glutinis* 生產 β -胡蘿蔔素之影響

4.2.2 改變培養方式

(1) 於培養期間對基質進行磨碎

為了更進一步的增加菌體所能生長的面積，本實驗將培養至 48 hr 的發酵物，移至無菌操作台中再進行一次磨碎的動作，此時的發酵物中 *R. glutinis* 已成為優勢菌種，降低了此動作染菌的風險，因培養期間有持續通氣，基質會較為乾燥，故在此時將以磨碎並不會因旋轉瓶持續轉動而又集結，藉此方式提高基質攪拌程度以及菌體所能生長之面積，來提高整體的菌量。

(2) 改變通氣方式之影響

由於原先藉由空壓機直接打入的氣體其濕度與基質本身差異太大，因此在短時間內基質含水量就會急遽下降，導致水活性降低，而影響菌體生長。故本實驗將通入氣體先通入水瓶中，再進入發酵瓶中，此方式所通入的氣體為飽和水蒸氣，長時間通入會致使基質過於潮濕，故採用以 12 hr 作為區間，來切換乾濕空氣的通入，藉此方式來保持培養期間基質的溼度以及水活性，提供菌體更為優渥的生長環境。

上述(1)(2)的培養方式對比於控制組的實驗結果如圖 4-18，可發現(1)培養方式對於 β -胡蘿蔔素效果並不明顯，僅高於控制組 0.43 mg/kg 發酵物，猜測應是 48 hr 後基質本身濕度及水活性已下降，磨碎後更加速了基質水分的散失，不利於菌體繼續生長；而(2)的培養方式效果較為明顯，對比於控制組提高了 1.5 倍左右， β -胡蘿蔔素可得到 6.39 mg/kg 發酵物的濃度，表示此方式確實如預期，使基質維持一定程度的溼度以及水活性，可使菌體長得更好。

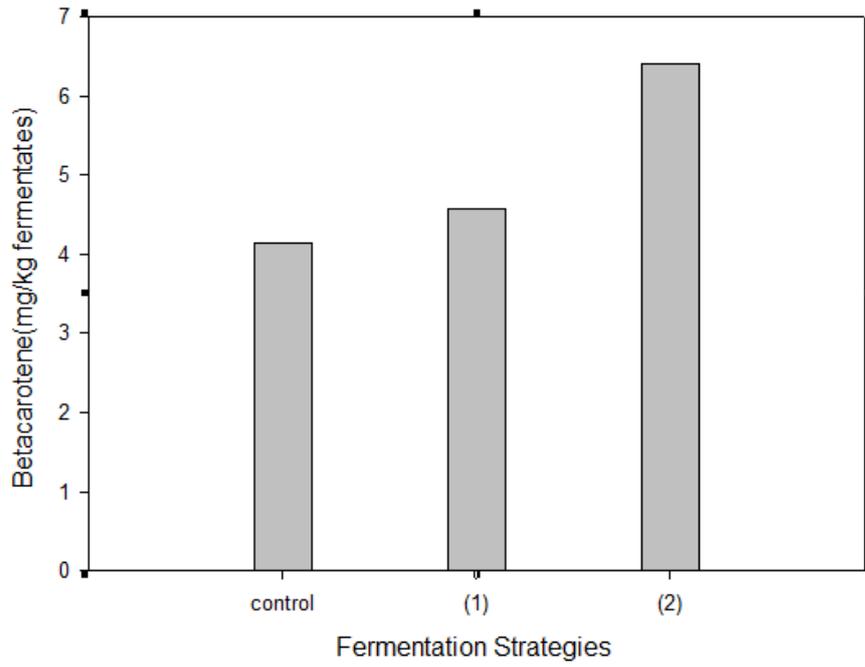


圖 4-18 不同培養方式(1) 於培養期間對基質進行磨碎；(2) 間歇性通入飽和氣體對 *R. glutinis* 生產 β -胡蘿蔔素之影響

4.2.3 間歇性通入飽和氣體-通氣量之影響

本實驗比較 1、2、3 L/min 三種通氣量，採用間歇性通入飽和氣體之方式，實驗結果如圖 4-19，以 1 L/min 培養效果較好，其 β -胡蘿蔔素可得到 7.03 mg/kg 發酵物，對比於控制組，約為控制組的 1.7 倍，而 2、3 L/min β -胡蘿蔔素分別為 6.39、3.99 mg/kg 發酵物， β -胡蘿蔔素隨著通氣量提升而下降，推測是進氣方式為間歇性通入飽和氣體，並以 12 hr 為區間，其中 12 hr 高通氣量的飽和氣體致使瓶內基質過濕而黏性增加，故大部分基質皆貼附在瓶壁上導致滾動效果變差，而基質濕度太高也會降低基質之多孔性導致氣體交換的效果變差。

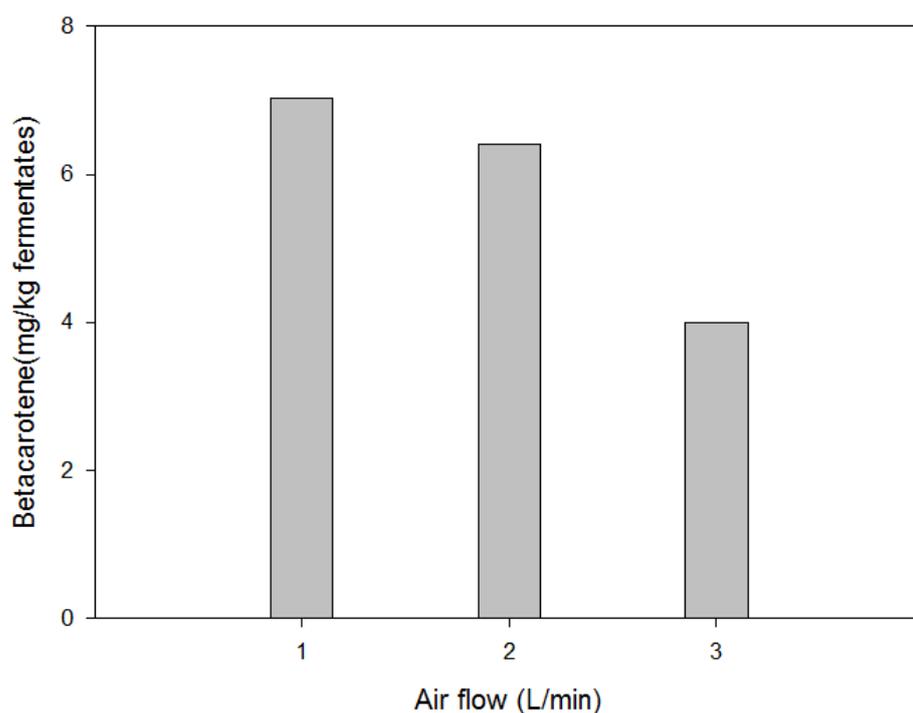


圖 4-19 間歇性通氣-進氣量之影響

4.3 深層液態搖瓶批次發酵程序

MVA 代謝路徑是合成 β -胡蘿蔔素主要路徑，而在 MVA 代謝路徑中，足量的前體供應，是影響合成 β -胡蘿蔔素的關鍵，故許多文獻中皆有針對 MVA 代謝路徑的中間物來操作藉此來增加 β -胡蘿蔔素。本實驗添加含有 MVA 代謝路徑的中間物(檸檬烯、茄紅素、脂肪酸)的物質(柑橘類果皮、番茄、市面上常見油類)，藉此提高 *R. glutinis* 生成 β -胡蘿蔔素的產量。

4.3.1 添加柑橘類果皮萃取液之影響

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，選用乙醇作為溶劑，利用少量乙醇提升 HMG-CoA 的活性，來誘導 β -胡蘿蔔素產生。而柑橘類果皮中所含之檸檬烯成分為異戊二烯之整數倍烯烴類，而異戊二烯屬於 β -胡蘿蔔素代謝路徑中重要的一環。

本實驗選用乙醇作為溶劑，極柑果皮為被萃取物，以烘乾磨碎後的果皮重(g)比乙醇體積(ml)為 1:100 的比例進行萃取，乙醇濃度為 95%，並將所得之萃取液經由減壓濃縮 4 倍後，固定添加量為 2 ml，藉由提高檸檬烯的濃度，來誘導菌體合成 β -胡蘿蔔素，由於乙醇以及檸檬烯成分皆會抑制菌體生長，而 β -胡蘿蔔素屬於二級代謝產物，故實驗設計為在不同時間點添加固定濃度之萃取液，來觀察 *R. glutinis* 的生長情形以及 β -胡蘿蔔素的生成。

實驗結果如圖 4-20，可發現在 0 hr 添加萃取液，菌體幾乎無法生長，可見乙醇以及檸檬烯成分皆有抑制菌體生長的能力，而 24 hr 雖有受到抑制，菌體還是有能力生長以及累積 β -胡蘿蔔素，但效果不彰，而 48 hr 後菌體對比於控制組可得知菌體已進入生長停滯期，原先預期在此時添加萃取液可以促進 *R. glutinis* 生成 β -胡蘿蔔素的，但結果並不如預期，故添加檸檬烯對於 *R. glutinis* 生成 β -胡蘿蔔素並沒有幫助，菌體反而受到抑制。

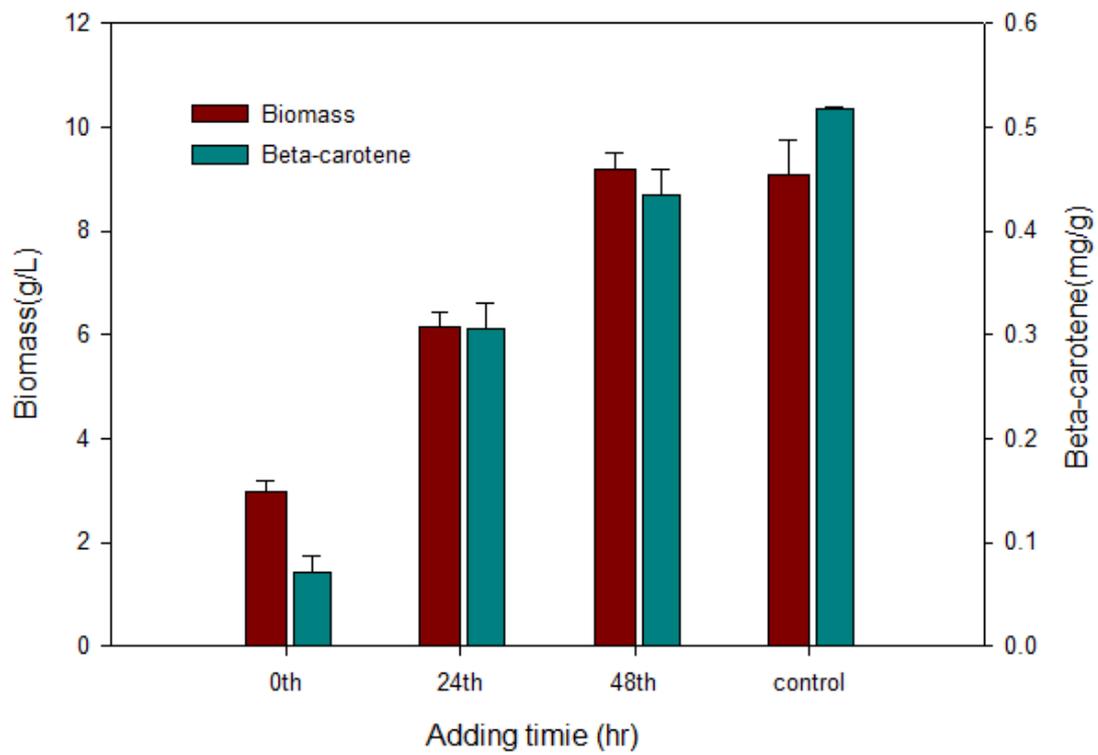


圖 4-20 柑橘類果皮萃取液添加時間點對 *R. glutinis* 之影響

4.3.2 添加植物油之影響

在菌體發酵期間添加少量脂肪酸、植物油或界面活性劑，可刺激菌絲體生長或代謝物的產量。添加 1 % 葵花油於培養基中有助於 *G.lucidum*-二次代謝物的生成，可將多糖含量自 0.13 mg/ml 提升至 0.18 mg/ml (Yang et al., 2000)；利用 *Streptomyces fradiae* 生產 Tylosin，發現以油脂作為碳源有助於提升菌量和 Tylosin 濃度 (Choi et al., 1996)。故油脂中所含脂肪酸對於菌量或者提升二次代謝物確實有其正面效益。

脂肪酸經代謝後可得乙烯輔酶 A，菌體藉由乙烯輔酶 A 進入 MVA 代謝路徑合成 β -胡蘿蔔素。因此本實驗添加富含脂肪酸之植物油作為誘導劑，促使菌體提高 β -胡蘿蔔素的產量。

I. 不同植物油之影響

本實驗於培養基中添加市面上常見之油類(軟棕櫚油、玄米油、大豆沙拉油、橄欖油、芥花油、葵花油)，其脂肪酸組成如表 4-2，添加濃度固定為 10 %，以及添加 1 g/L 的 Tween 80 降低因油脂層覆蓋液面而影響表面通氣的影響。實驗結果如圖 4-21，可發現植物油添加對於菌量以及 β -胡蘿蔔素皆有正面的效益，其中菌量表現最好的為芥花油，可達 10.4 g/L，而 β -胡蘿蔔素表現最好的則為玄米油，濃度為 0.38 mg/g，對比於控制組，分別提高了約 20 % 的菌量以及 46 % 的 β -胡蘿蔔素，而後續實驗考量了各油品價格如表 4-3，選用了兩者表現皆不錯(9.86 g/L、0.37 mg/g)的軟棕櫚油作為添加油品。

II. 添加不同濃度軟棕櫚油之影響

本實驗選用軟棕櫚油進行添加，探討不同添加濃度(0.5、1、2.5、5、10、15%)對於 *R. glutinis* 的菌量以及 β -胡蘿蔔素之影響，實驗結果如圖 4-22，菌量隨著添加濃度提高而有所提高，在 2.5% 之後開始趨於平緩，猜測是過多的油脂阻隔了搖瓶液面與空氣的接觸，降低表面通氣而影響了菌體生長，並且搖瓶因無法控制 pH，培養期間 pH 會持續降低，不利於菌體生長，而 β -胡蘿蔔素也是在 2.5% 達到最高，故認為 2.5% 為最佳的添加濃度，菌量以及 β -胡蘿蔔素分別達到 11.5 g/L、0.33 mg/g，後續以 2.5% 的濃度添加放大至 5 L 攪拌式發酵槽進行實驗。

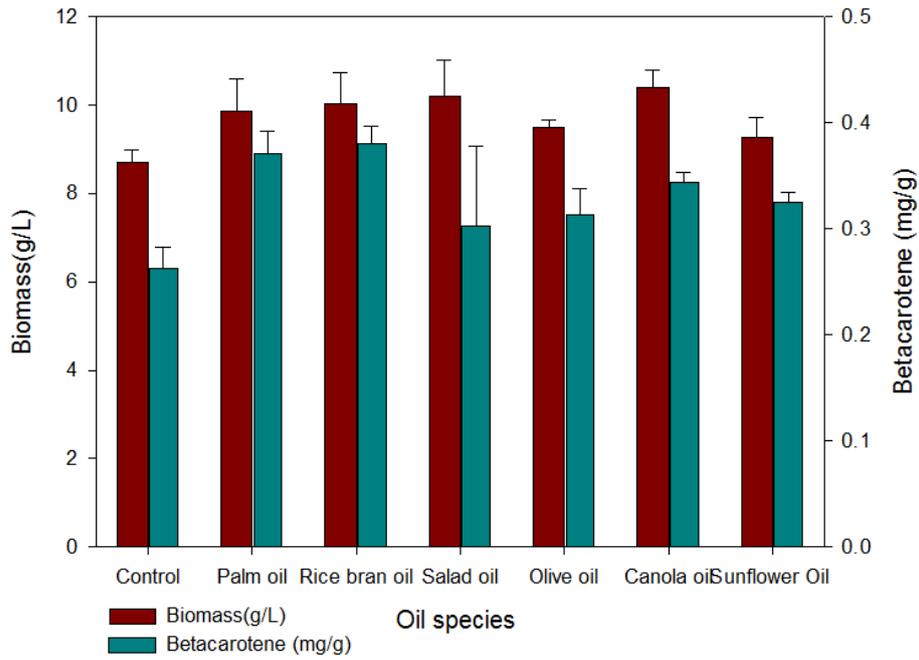


圖 4-21 不同植物油 10 % 以及 1 g/L Tween 80 對 *R. glutinis* 之影響

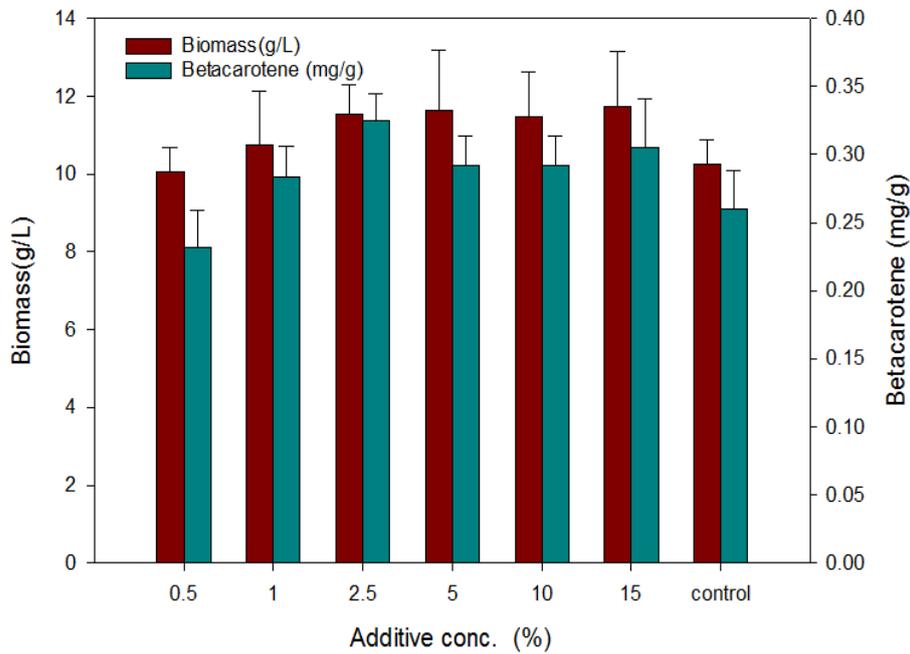


圖 4-22 不同濃度之軟棕櫚油添加對 *R. glutinis* 之影響

表 4-2 各油品脂肪酸組成

油脂種類	Saturated Fatty Acid	Unsaturated Fatty Acid
Palm oil (軟棕櫚油)	Palmitic Acid (棕櫚酸) 43.5%	Linoleic Acid (亞油酸) 9.1%
	Stearic Acid (硬脂酸) 4.3%	Oleic Acid (油酸) 36.6%
	Myristic Acid (肉豆蔻酸) 1%	
Rice bran oil (玄米油)	Palmitic Acid (棕櫚酸) 21.5%	Linoleic Acid (亞油酸) 34.4%
	Stearic Acid (硬脂酸) 2.9%	α -Linoleic Acid (α 亞麻油酸) 2.2%
	Myristic Acid (肉豆蔻酸) 0.6%	Oleic Acid (油酸) 38.4%
Soybean Salad oil (大豆沙拉油)	Palmitic Acid (棕櫚酸) 6-8%	Linolenic Acid (亞油酸) 52%-65%
	Arachidic Acid (花生酸) 0.1%-0.4%	α -Linoleic Acid (α 亞麻油酸) 2%-3%
	Stearic Acid (硬脂酸) 3%-5%	Oleic Acid (油酸) 25%-36%
Olive oil (橄欖油)	Palmitic Acid (棕櫚酸) 13%	Linoleic Acid (亞麻油酸) 15%
	Palmitoleic Acid (棕櫚油酸) 0.3%-3.5%	α -Linoleic Acid (α 亞麻油酸) 0.5%
	Stearic Acid (硬脂酸) 1.5%	Oleic Acid (油酸) 70%
Canola oil (芥花油)	Palmitic Acid (棕櫚酸) 4%	Linoleic Acid (亞油酸) 21%
	Stearic Acid (硬脂酸) 2%	α -Linoleic Acid (α 亞麻油酸) 9%-11%
		Oleic Acid (油酸) 61%
Sunflower oil (葵花油)	Palmitic Acid (棕櫚酸) 5%	Linoleic Acid (亞油酸) 59%
	Stearic Acid (硬脂酸) 6%	Oleic Acid (油酸) 30%

表 4-3 各油品價格

植物油種類	Price (NTD) for 1L
Palm oil (軟棕櫚油)	80-100
Rice bran oil (玄米油)	220-340
Soybean Salad oil (大豆沙拉油)	55-75
Olive oil (橄欖油)	250-360
Canola oil (芥花油)	90-100
Sunflower oil (葵花油)	100-120

4.3.3 不同 C/N ratio 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 *R. glutinis* 生長之影響，文獻(Braunwald, Schwemmlin et al. 2013)指出 C/N 提高能提升 β -胡蘿蔔素的合成，故本實驗設計為固定氮源濃度($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L)，改變碳源濃度(glucose, 30、60、120 g/L)，將 C/N 分為高中低三部分，實驗結果如圖 4-23，隨著碳源濃度提升，菌量以及 β -胡蘿蔔素也有隨之提升的趨勢，但碳源濃度為 60、120 g/L 之間的差異並不大，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，並且因一次給予過多碳源濃度下，菌體反而將過多的碳源用於 β -胡蘿蔔素的合成。

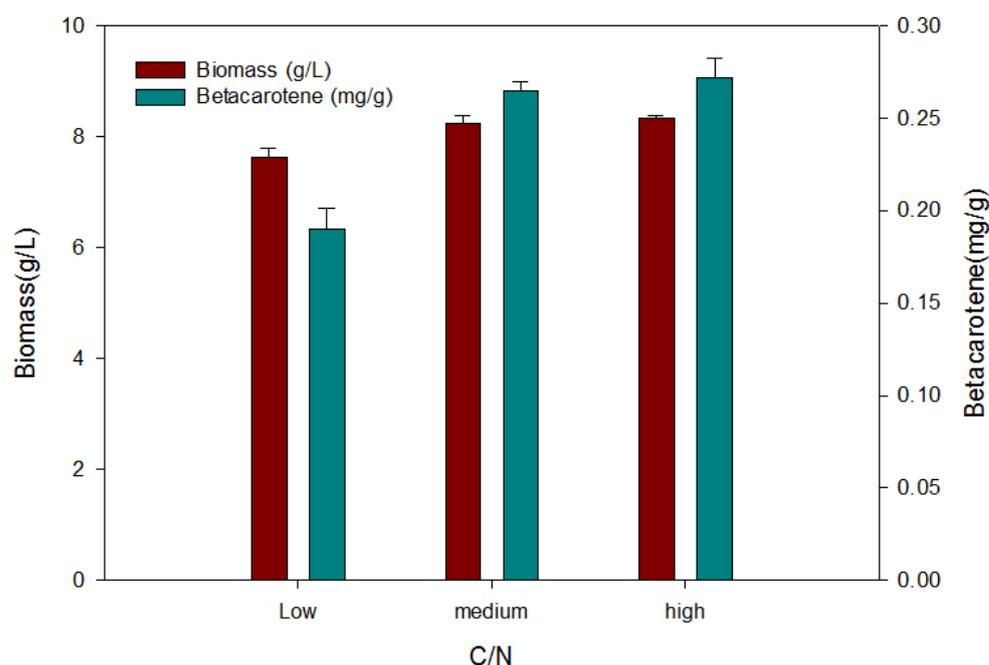


圖 4-23 不同程度之 C/N ratio[(Low, 30:1)、(Medium, 60:1)、(High, 120:1)]對

R. glutinis 生成 β -胡蘿蔔素之影響

4.4.5 L 攪拌式發酵槽批次發酵程序

本實驗利用 5 L 攪拌式發酵槽進行 *R. glutinis* 放大培養，探討搖瓶實驗之最適添加油種以及濃度，放大至發酵槽的變化。

4.4.1 添加 2.5 % 軟棕櫚油、1 g/L Tween 80 之影響

本實驗選用搖瓶實驗所作之條件(軟棕櫚油、2.5 %)進行測試，實驗結果對比控制組如圖 4-24，在 159 hr 菌體達到最大濃度 29.8 g/L，比控制組最大濃度提高約 78 %，可見在有控制 pH 以及溶氧的情況下，菌體生長不再受限於 pH 過低，而 β -胡蘿蔔素在起始 15 hr 即可達到 0.25 mg/g，而控制組則需要 72 hr 才能達到此濃度，應是軟棕櫚油內富含大量脂肪酸供菌體代謝成乙醯輔酶 A，直接進入 MVA 代謝路徑合成 β -胡蘿蔔素，而控制組必須要等到菌體生長停滯期才會開始快速累積。

綜合上述，由表 4-4 可得知雖然添加軟棕櫚油所得之 β -胡蘿蔔素最大濃度與控制組相當，但菌量得到大幅提升，故整體之 β -胡蘿蔔素產量增加，因此添加軟棕櫚油確實有助於提高 β -胡蘿蔔素的產量；在脂質部分由表 4-4 可得知添加 2.5 % 軟棕櫚油對於脂質方面也有所助益，其脂質產率由 0.061 g/L/hr 提升至 0.119 g/L/hr，而表 4-5 顯示軟棕櫚油之添加使得 *R. glutinis* 脂肪酸組成有了變化，其中飽和脂肪酸(硬脂酸、棕櫚酸)的比例皆提升 3~4 %，而不飽和脂肪酸皆有下降其中油酸比例有了大幅變化由原先 28 % 下降至 18 %，而亞麻油酸下降 2~3 %，此種變化影響了生質柴油的流動點、霧點、十六烷值、氧化安定性。飽和脂肪酸提高而不飽和脂肪酸降低致使流動點提高、霧點提高、十六烷值提高、氧化安定性較佳，而台灣屬於亞熱帶區域，故流動點、霧點越低越好；十六烷值部分，較高的十六烷值能促使柴油燃料有較好的自動著火品質，不但使燃料有較佳的點火品質，更可減少排氣中污染物質的含量，亦能縮短燃料從噴射到自動著火的間隔時

間減少燃氣滯留於燃燒室的時間；氧化安定性愈高則生質柴油不易氧化，更有利於燃油的保存和燃燒(Hiroaki Imahara et al., 2006；李唐、張志毓，2006)。

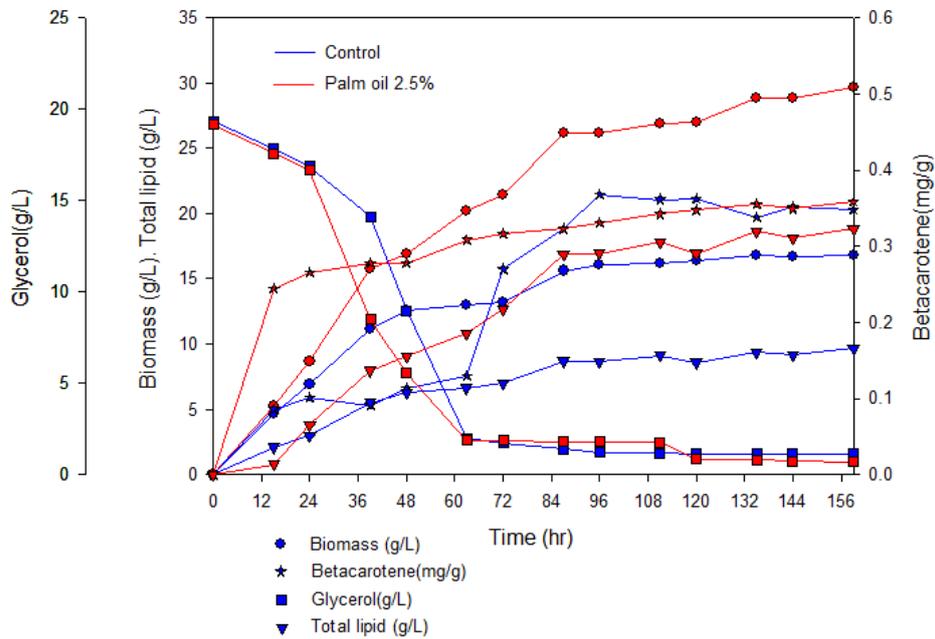


圖 4-24 5 L 攪拌式發酵槽-添加軟棕櫚油 2.5 % 之影響

表 4-4 5 L 攪拌式發酵槽添加 2.5 % 軟棕櫚油之動力學參數變化

	Max. biomass (g/L)	Max. β -carotene (mg/g)	Max. biomass productivity (g/L/hr)	Max. β -carotene productivity (mg/L/hr)	Glycerol consumption rate (g/L/hr)	Max. lipid productivity (g/L/hr)
Cotrol	16.8	0.368	0.106	0.037	0.274	0.061
2.5 % palm oil	29.8	0.358	0.187	0.067	0.276	0.119

表 4-5 添加 2.5 % 軟棕櫚油脂肪酸組成變化

主要脂肪酸	Control (%)	添加 2.5 % 軟棕櫚油 (%)
C16:0 (棕櫚酸)	4.3	8.7
C18:0 (硬脂酸)	21.8	24.8
C18:1 (油酸)	28.7	18.6
C18:2 (亞麻油酸)	35.2	32.9
C18:3 (次亞麻油酸)	0.39	0.15

4.5 5 L 氣舉式發酵槽批次發酵程序

本實驗利用 5 L 攪拌式發酵槽進行 *R. glutinis* 放大培養，探討搖瓶實驗之最適添加油種以及濃度，放大至發酵槽的變化。

4.5.1 添加 2.5 % 軟棕櫚油、1 g/L Tween 80 之影響

本實驗選用搖瓶實驗所作之條件(軟棕櫚油、2.5 %)放大至 5 L 氣舉式發酵槽進行測試，實驗結果如圖 4-25，在 159 hr 之後菌體濃度呈現持平可得約 24 g/L， β -胡蘿蔔素則在 87 hr 後持平可得約 0.27 mg/g，本實驗結果對比於 5 L 攪拌式發酵槽，可發現使用攪拌式發酵槽對於菌量以及 β -胡蘿蔔素更優於氣舉式發酵槽，其中由表 4-6 可得知甘油消化速率 0.27 g/L/hr 高於氣舉式的 0.19 g/L/hr，而攪拌式之菌體成長速率 0.19 g/L/hr 也高於氣舉式的 0.13 g/L/hr，推測是所使用之碳源以及軟棕櫚油皆為油脂，並不易將其與培養基混和均勻，而攪拌式發酵槽藉由高轉速以及轉動葉片雖然會造成高剪切力對菌體造成傷害，卻可以使培養基攪拌更均勻，其攪拌效果更優於氣舉式發酵槽，故菌體對於甘油以及所添加之軟棕櫚油有更好的吸收，因此在菌量及 β -胡蘿蔔素的累積上表現較佳。

對於脂質部分，由表 4-6 得知攪拌式其脂質累積速率 0.119 g/L/hr 高於氣舉式的 0.07 g/L/hr，推測是氣舉式提供較高的溶氧環境較不利於脂質累積，文獻指出低溶氧的環境較有利於脂質累積(張智勇, 2011)，而攪拌式將溶氧控於 30 % 相對較有利。

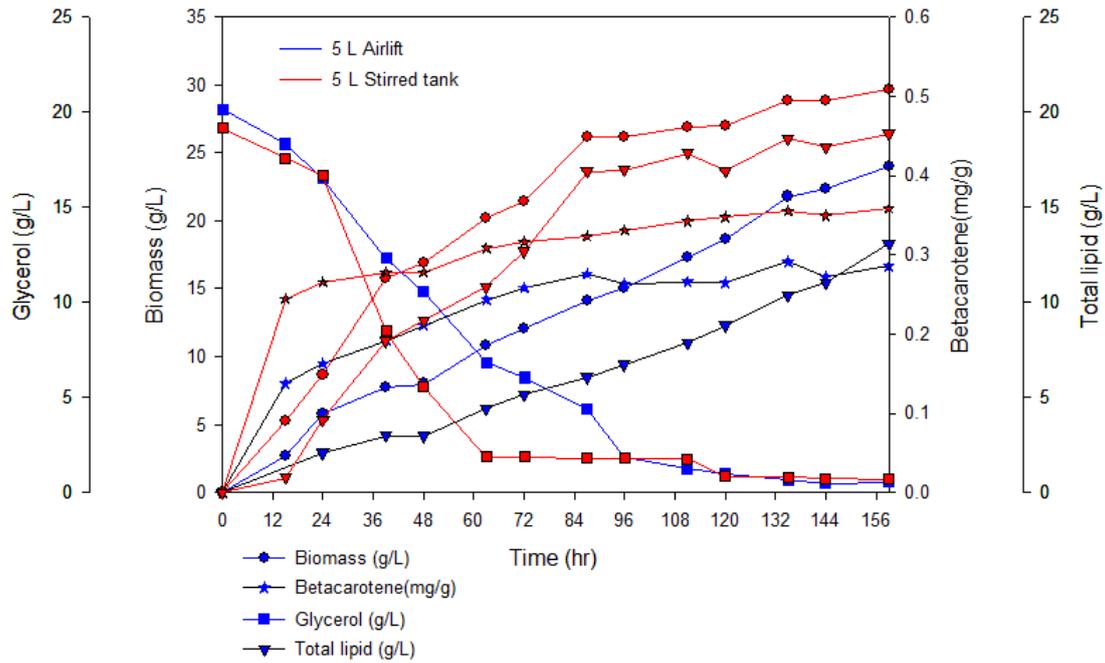


圖 4-25 軟棕櫚油 2.5 % 添加-5 L 氣舉式 v.s 5 L 攪拌式發酵槽

表 4-6 5 L 氣舉式發酵槽添加 2.5 % 軟棕櫚油之動力學參數變化

	Max. biomass (g/L)	Max. β -carotene (mg/g)	Max. biomass productivity (g/L/hr)	Max. β -carotene productivity (mg/L/hr)	Glycerol consumption rate (g/L/hr)	Max. lipid productivity (g/L/hr)
5 L 攪拌 式	29.8	0.358	0.187	0.067	0.27	0.119
5 L 氣 舉式	24.5	0.291	0.127	0.011	0.19	0.07

4.6 50 L 氣舉式發酵槽發酵程序

4.6.1 Fed-batch-低 C/N ratio 之影響

本實驗利用饋料批次改變培養基中的碳源(粗甘油)氮源(硫酸銨、酵母萃取物)的比例，探討不同 C/N ratio 對生長中的 *R. glutinis* 之影響。本實驗分為兩部份，第一部分是在菌體於停滯生長期時，饋料 60 g/L 的粗甘油、1 g/L 的硫酸銨以及 1 g/L 的酵母萃取物，藉此改變培養基中的 C/N ratio，實驗結果如圖 4-26，可發現菌量在饋料之後持續提高，於 159 hr 菌量可得約 43.6 g/L，而 β -胡蘿蔔素約在 0.18 mg/g 之後呈現持平，此部分實驗將作為第二部分之對照組。

第二部分是在菌體處於停滯生長期時，只饋料 60 g/L 的粗甘油，藉此拉高培養基中的 C/N ratio，實驗結果如圖 4-27，可發現提高培養期間培養基中的 C/N ratio 對比於控制組， β -胡蘿蔔素並無太大差異約在 0.2 mg/g，菌量於 159 hr 可得約 34.5 g/L，由表 4-7 可得知其實驗組之菌體成長速率為 0.217 g/L/hr，對比控制組的 0.27 g/L/hr 表現較差，應是氮源受到限制影響了菌體生長，而脂質部分也因氮源受到限制而有了顯著提升，其脂質含量也由 41 % 提升至 60 %，推測應是菌體將多餘碳源轉而累積油脂。

表 4-7 50 L 氣舉式發酵槽 Fed batch 之動力學參數變化

	Max. biomass (g/L)	Max. β -carotene (mg/g)	Max. biomass productivity (g/L/hr)	Max. β -carotene productivity (ug/L/hr)	Max. lipid productivity (g/L/hr)	Max. lipid content (%)
Control	43.6	0.188	0.19	1.39	0.127	41.02
Experient	34.5	0.225	0.22	1.40	0.128	60.00

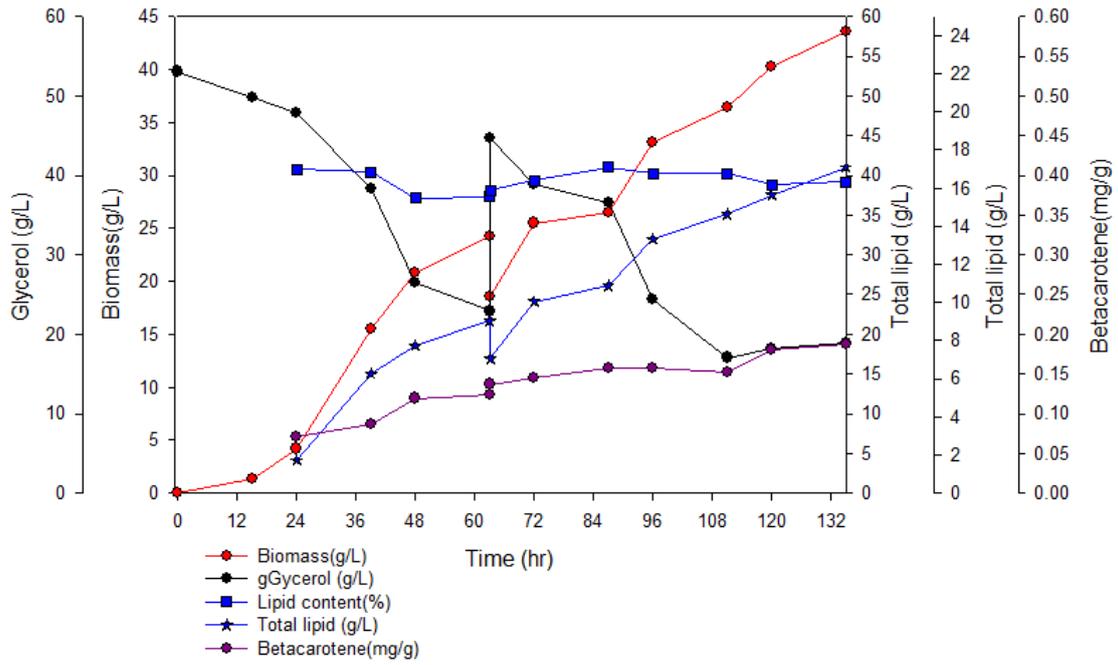


圖 4-26 Fed batch-control

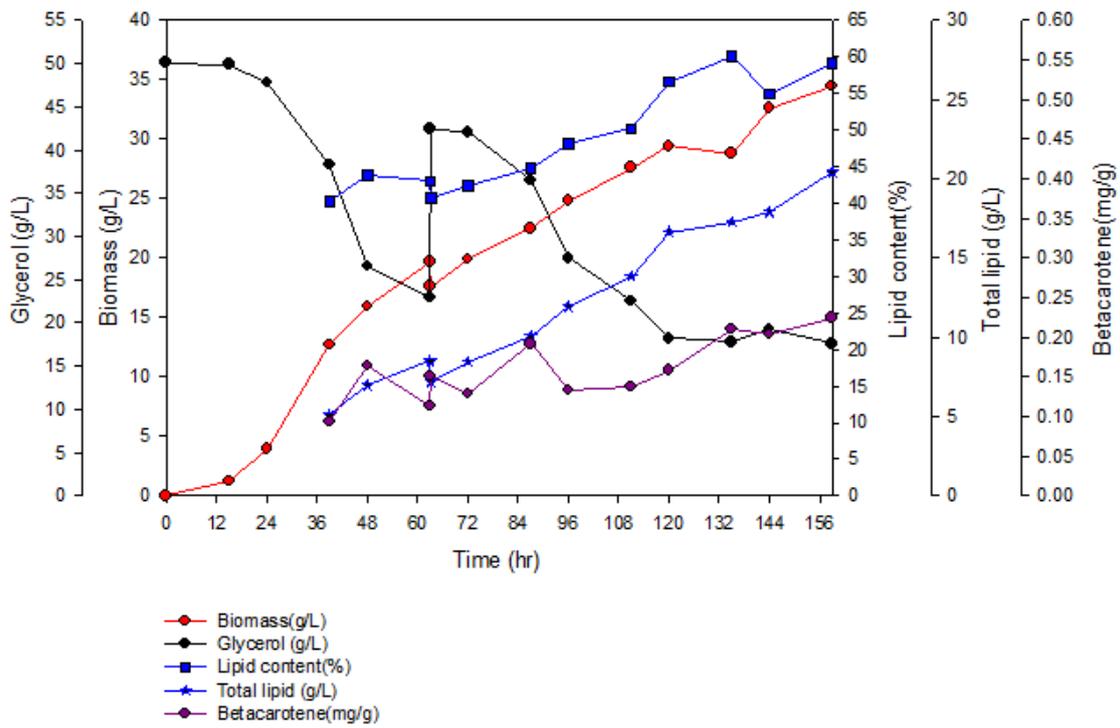


圖 4-27 Fed batch-高 C/N ratio 之影響

4.7 蛋雞餵養實驗

由於 β -胡蘿蔔素可作為飼料之增色劑，並且蛋雞在食用含有 β -胡蘿蔔素之飼料，可將其代謝至所產之雞蛋中(Sofia Fredriksson et al., 2006)，因此為了可以產出更富含營養素的蛋，許多業者皆會在飼料中添加胡蘿蔔素，但胡蘿蔔素有些是人工化合物，吃多了對身體有害，因此在飼料中添加天然的胡蘿蔔素是消費者較能接受的。

本實驗設計將固態及液態培養所得之菌體餵養蛋雞，表為固態及液態的培養條件以及所含 β -胡蘿蔔素。基於不影響蛋雞生長的前提下，故將添加比例設為 10 % 菌體混於 90 % 原飼料中，其中固態培養是以烘乾之發酵物直接添加，而液態培養則是添加發酵所得之發酵液經由離心、萃取並真空乾燥之後所得之菌粉，實驗結果如表 4-8，可發現使用液態菌粉 10 % 搭配原飼料 90 % 連續餵養 144 hr 後，蛋黃中所含之 β -胡蘿蔔素濃度由 1.53 提升 3.73 mg/kg egg yolk，提高約 2.5 倍，而使用固態發酵物 10 % 搭配原飼料 90 % 連續餵養 144 hr 後，蛋黃所含之 β -胡蘿蔔素濃度提升了約 1.4 倍，可見蛋雞確實可將飼料中所得之 β -胡蘿蔔素代謝至所產的雞蛋中。各組雞蛋最終顏色如圖 4-28、4-29、4-30，由於 β -胡蘿蔔素為維生素 A 之前體，並且雞蛋是人類普遍皆會食用之食品，而表 4-9 是中華民國成人一天所需維生素 A 攝取量，可見實驗結果不如預期，食用餵養含有 *R. glutinis* 的飼料所得之雞蛋，並不足以提供一天建議攝取的維生素 A。

表 4-8 固態及液態培養條件及所得菌體之 β -胡蘿蔔素含量

培養條件	β -胡蘿蔔素 (mg/g)
固態培養 200 g 玉米；less than 0.85 mm；含水量 70 %；培養 96 hr；通氣量 2 L/min	4.17
液態培養 50 L Airlift(fed batch)；1.5 vvm；粗甘油、硫酸銨	0.18



圖 4-28 蛋雞飼養實圖



圖 4-29 蛋雞進食(混合菌粉)實圖

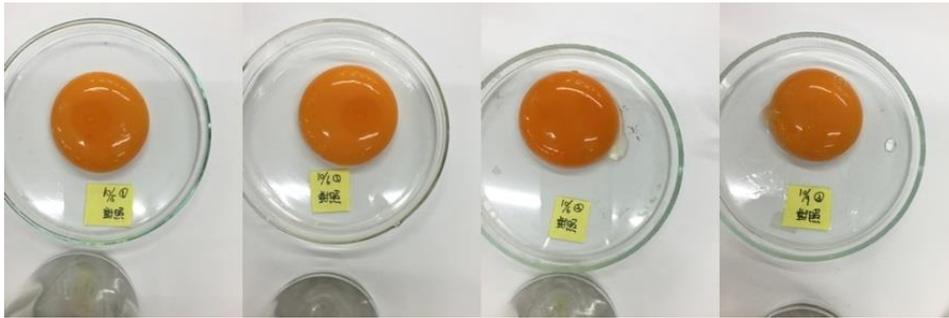


圖 4-30 控制組蛋黃最終顏色變化

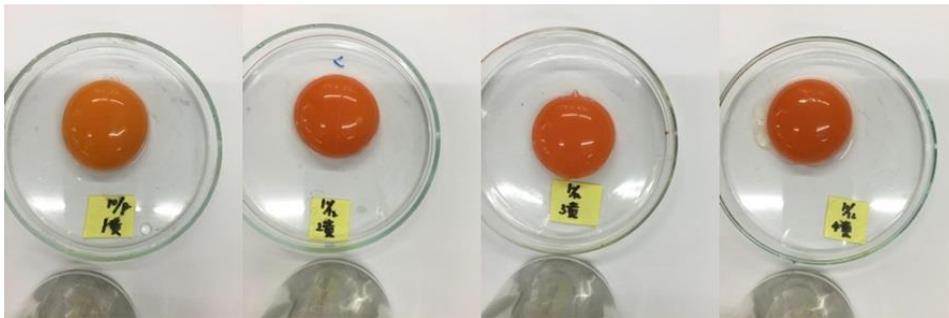


圖 4-31 液態 10% 蛋黃最終顏色變化

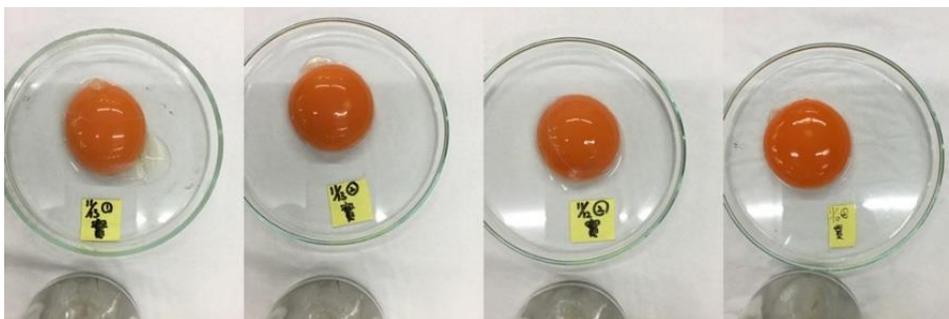


圖 4-32 固態 10% 蛋黃最終顏色變化

表 4-9 不同飼料連續餵養 144 hr，雞蛋所含之 β -胡蘿蔔素

	β -胡蘿蔔素(mg/kg egg yolk)	β -胡蘿蔔素(ug)
Control -100% feed	1.53±0.035	45.9±1.04
10% Liquid +90% feed	3.73±0.057	118.8±1.72
10% Solid +90% feed	2.18±0.092	65.5±2.78

表 4-10 國際標準成人一天所需維生素 A 攝取量 (行政院衛生署)

年齡層	維生素 A (ug R.E)	
	男	女
20 歲~	500	500
25 歲~	600	500
35 歲~	600	500
55 歲~	600	500
70 歲~	600	500

註:1 ug R.E=1 ug 視網醇=6 ug β -胡蘿蔔素

表 4-11 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 / Nitrogen source	Max. biomass (g/L)	Max. β -carotene content (mg/g)	Max. β -carotene conc. (mg/L)	Max. β -carotene productivity (mg/L/hr)	Reference
Batch- 5 L stirred tank	Glucose / Ammonium sulfate	28.1		4.2	0.07	Zhiping Zhang et al., 2014
Batch- 1 L stirred tank (0.7 vvm)	Glucose / Yeast extract	16	0.09±0.02	1.44	0.02	Prakash Bhosale et al., 2001
Batch- 125 ml shker	Hydrolyzed mung bean waste flour / Sweetpotato extract	10.35±0.13		3.48±0.02		J. Tinoi et al., 2005
Continuous - 3 L stirred tank (1 vvm), dilution rate 0.24 hr ⁻¹	Radish brine	1.4		0.08	0.02	C. Malisorn and W. Suntornsuk 2009
Batch -5 L Stirred tank (1 vvm, DO 30%)	Crude glycerol Ammonium	29.7	0.358	10.64	0.067	This study

sulfate						
Batch-5 L Airlift (1.5 vvm)	Crude glycerol Ammonium sulfate	24.5	0.291	7.13	0.011	This study
Fed batch -50 L airlift (1.5 vvm) 60 g/L crude glycerol 2 g/L ammonium sulfate	Crude glycerol Ammonium sulfate	43.6	0.19	8.28	0.061	This study
Fed batch -50 L airlift (1.5 vvm) 60 g/L crude glycerol	Crude glycerol Ammonium sulfate	34.5	0.22	7.59	0.0478	This study

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

本實驗利用 *Rhodotorula glutinis* 培養，分成三大部分進行研究：(1)固態實驗利用搖瓶以及 2 L 固態旋轉瓶探討 *R. glutinis* 的生長與環境因子之關係；(2)液態實驗利用搖瓶、5 L 攪拌式發酵槽、5 L 氣舉式發酵槽、50 L 氣舉式發酵槽探討誘導物以及 C/N ratio 對 *R. glutinis* 的生長之關係；(3)兩種發酵型態所得之發酵產物應用於蛋雞餵養實驗。以下整理出幾點結論：

➤ 固態搖瓶

1. *R. glutinis* 之最適化條件為玉米作為基質、含水量 65 %、粒徑小於 0.85 mm、培養時間為 96 hr。
2. 於基質中添加碳源(蔗糖)、氮源(硫酸銨)有助於菌體生長以及 β -胡蘿蔔素之累積，其中蔗糖濃度/硫酸銨濃度為 4 是本實驗最佳添加比例。
3. 於培養前對基質進行切塊可提高菌體生長面積且更有效吸收基質養分，有助於菌體生長，
4. 照光對於固態培養 *R. glutinis* 並無明顯作用，推測應是固態菌量少，故照光影響有限。

➤ 固態 2 L 旋轉瓶

1. 2 L 旋轉瓶單瓶之基質量以 200 g 最佳，太高則 β -胡蘿蔔素下降，推測是瓶內過於壅擠導致通氣不佳以及基質滾動效果變差；太少雖然 β -胡蘿蔔素略高，但對於產量來說，效益太差。

2. 於培養期間將基質進一步磨碎，雖可提高其生長面積，但成效不好，推測應是基質在含水量已下降的情況下菌體已不再繼續生長
3. 將通氣方式改為間歇性通入飽和氣體，以 12 hr 為區間，對於菌體生長有明顯助益推測此方式確實可維持基質含水量以及水活性。

➤ 液態搖瓶實驗

1. 於培養基中添加柑橘類果皮之萃取液來提高檸檬烯之含量對於 *R. glutinis* 合成 β -胡蘿蔔素並無助益，其中檸檬烯成分以及作為萃取溶劑之乙醇反而抑制了菌體生長，菌量明顯下降。
2. 植物油之添加可提高 β -胡蘿蔔素之產量而菌體濃度並無明顯差異，推測是在 pH 較低的環境中，菌體已無法繼續生長，而植物油富含的脂肪酸為 β -胡蘿蔔素代謝路徑中重要的一環，適當的添加可作為誘導劑，提升 β -胡蘿蔔素的產量。
3. 固定氮源濃度改變碳源濃度(30、60、120 g/L)，在碳源濃度高的情況下，對於菌體濃度沒有明顯的影響，而 β -胡蘿蔔素濃度上升，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。

➤ 液態 5 L 攪拌式發酵槽

軟棕櫚油之添加對比於控制組，菌體濃度以及脂質含量得到顯著提升而最大 β -胡蘿蔔素濃度差異不大，並且影響 *R. glutinis* 之脂肪酸組成，其飽和脂肪酸提高不飽和脂肪酸下降，此變化現象影響了生質柴油的許多物性，提高了流動點、霧點、十六烷值以及氧化安定性，其中十六烷值及氧化安定性提高有利於生質柴油之品質。

➤ 液態 5 L 氣舉式發酵槽

軟棕櫚油之添加放大至氣舉式發酵槽，與攪拌式發酵槽相比，雖降低剪切力，提供較高的溶氧，然而攪拌效果較差，故在菌量、β-胡蘿蔔素以及脂質累積的表現較攪拌式發酵槽差。

➤ 液態 50 L 氣舉式發酵槽

利用 Fed batch 提高培養基中的 C/N ratio 有助於累積油脂，對於 β-胡蘿蔔素影響不大，推測是在有控制 pH、且氮源濃度受到限制的情況下，菌體更傾向將過多的碳源用於脂質的累積。

➤ 蛋雞餵養實驗

在飼料中添加 *R. glutinis* 液態及固態之發酵產物確實可使雞蛋增色，並使蛋黃中 β-胡蘿蔔素濃度提升，提升雞蛋營養價值，而對於維生素 A，10 % 發酵產物添加於飼料中所得之雞蛋，並不足以滿足成人一天所需攝取量。

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，固態培養利用間歇性通入飽和氣體可有效維持基質含量及水活性，在固定通氣量的情況下，探討以不同時間區隔來切換乾空氣通入，可避免基質濕度過於乾燥或潮濕，更有利於菌體生長。

而在 Fed batch 改變 C/N ratio 部分，當菌數量達到某一程度之後，再以一次性饋料方式饋入 pH 較低之高碳源濃度之培養液(不含氮源)，藉此降低 pH 提高促使菌體合成 β -胡蘿蔔素。

在添加植物油部分，不同植物油對於微生物皆有不同的影響，故可以嘗試在不同時間點添加不同植物油，藉此提高菌體濃度以及 β -胡蘿蔔素濃度；添加植物油對於菌體脂肪酸組成有所影響，而不同脂肪酸組成對於生質柴油有不同的影響，故可以嘗試添加不同植物油探討菌體脂肪酸組成，藉此方式來提高轉酯所得之生質柴油品質。

參考文獻

- 丁苏，张劲，张瑛，杨莹，管敬喜，文仁德，李玮 (2014)。利用葡萄枯枝蔓发酵生产木霉菌剂的初步研究。Research Report。
- 余依嬛 (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。
- 李唐,張志毓 (2006)。台灣潛在的生質柴油料源對其產出生質柴油物性的探討。台灣潛在的生質柴油料源對其產出生質柴油物性的探討 67-73。
- 吳澤松,陳溢佑,劉嘉晏,鄭駿豪,陳明鴻,葉信甫,翁偉誌 (2008)。棕櫚生質柴油低溫流動點改善之研究。崑山科技大學機械學系助理教授,研究生。
- 洪嘉男 (2007)。應用培養 *Ganoderma lucidum* 生產 Polysaccharide-油脂及界面活性劑添加效應之探討。中興大學 化學工程所碩士論文。
- 馬德威 (2012)。柑橘類果皮添加對樟芝代謝生理活性物質之影響。東海大學 化學工程與材料工程所博士論文。
- 黃伯欣 (2008)。利用日本麴菌進行液態發酵和固態發酵生產果糖轉移酶。大同大學 生物工程研究所碩士論文。
- 劉懿嫻 (2014)。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。東海大學 化學工程與材料工程研究所碩士論文。
- 蔣雅慧 (2005)。添加物對樟芝菌絲與抗氧化活性生成之影響。東海大學 化學工程與材料工程所碩士論文。
- Ashok Pandey “Solid-state fermentation” Biochemical Engineering Journal (2002); 13: 81-84

- Ayerim Hernandez-Almanza, Julio Montanez-Saenza, Cristian Marti ́nez-Avila, Raul Rodriguez-Herrera, Cristobal N. Aguilar “Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation” Food Bioscience (2014); 7: 31-36
- Ayerim Hernandez-Almanza, Julio Cesar Montanez, Miguel A. Aguilar-Gonzalez, Cristian Martinez-Avila, Raul Rodriguez-Herrera, Cristobal N. Aguilar “*Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry” Food Bioscience (2014); 5: 64-72
- Changhua Hu, Yi Zou, Wenting Zhao “Effect of soybean oil on the production of mycelial biomass and pleurotulin in the shake-flask culture of *Pleurotus mutilis*” World Journal of Microbiology and Biotechnology (2009); 25: 1705-1711
- Chanika Saengae, Benjamas Cheirsilpb “Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids” Process Biochemistry (2011); 46: 210-218
- Malisorn C, Suntornsuk W. “Improved β -carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation” Biochemical Engineering Journal (2009); 43: 27-32
- Malisorn C, Suntornsuk W. “Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine” Bioresource Technology (2008); 99: 2281-2287
- Hiroaki Imahara, Eiji Minami, Shiro Saka “Thermodynamic study on cloud point of biodiesel with its fatty acid composition” Fuel (2006); 85: 1666-1670

- Hiroshi Shimada, Keiji Kondo, Paul D. Fraser, Yutaka Miura, Tishiko Saito and Norihiko Misawa “Increased Carotenoid Production by the Food Yeast *Candida utilis* through Metabolic Engineering of the Isoprenoid Pathway” Applied and environmental microbiology (1998); 64: 2676-2680
- Jing Zhao, Qingyan Li, Tao Sun, Xinna Zhu, Hongtao Xu, Jinlei Tang, Xueli Zhang, YanheMa “Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production” Metabolic Engineering (2013); 17: 42-50
- Jinlong Hu, Yanxu Lin, Zhenting Zhang, Ting Xiang, Yuxia Mei, Shumiao Zhao, Yunxiang Liang “High-titer lactic acid production by *Lactobacillus pentosus* FL0421 from corn stover using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation” Bioresource Technology (2016); 214: 74-80
- Tinoi J, Rakariyatham N, Deming R.L. “Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate” Process Biochemistry (2005); 40: 2551-2557
- Konstantina Nanou, Triantafyllos Roukas “Waste cooking oil: A new substrate for carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation” Bioresource Technology (2016); 203: 198-203
- Leya Thomas, Christian Larroche, Ashok Pandey “Current developments in solid-state fermentation” Biochemical Engineering Journal (2013); 81: 46-161
- Liu Shao, Li Qi, Liu Hui-lin, Jia Tao, Xie Da-ping “Mutation Breeding of High-Yield Carotenoid Producing *Rhodotorula mucilaginosa* by N⁺ Implantation and Optimization of Solid-state Fermentation Conditions for Carotenoid Production” Food science (2012); 33: 244-248

- Vustin M.M, Belykh E.N, and Kishilova S.A "Relationship between astaxanthin production and the intensity of anabolic processes in the yeast *Phaffia rhodozyma*" Microbiology (2004); 73: 643-649
- Pattana Sripalakit, Janya Riunkesorn, Aurasorn Saraphanchotiwitthaya "Utilisation of vegetable oils in the production of lovastatin by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in submerged cultivation" Maejo International Journal of Science and Technology (2011); 5: 231-240
- Prakash Bhosale, R.V. Gadre "Production of β -carotene by a *Rhodotorula glutinis* mutant in sea water medium" Bioresource Technology (2001); 76: 53-55
- Rene Verwaal, Jing Wang, Jean-Paul Meijnen, Hans Visser, Gerhard Sandmann, Johan A. van den Berg, and Albert J. J. van Ooyen "High-Level Production of Beta-Carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by Successive Transformation with Carotenogenic Genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*" Applied and environmental microbiology (2007); 73: 4342-4350
- Roadjanakamolson, M. and W. Suntornsuk "Production of β -Carotene-enriched rice bran using solid-state fermentation of *Rhodotorula glutinis*" Journal of Microbiology and Biotechnology (2010); 20: 525-531
- Sang-Hwal Yoon, Sook-Hee Lee, Amitabha Das, Hee-Kyoung Ryu, Hee-Jeong Jang, Jae-Yean Kim, Deok-Kun Oh, Jay D. Keasling, Seon-Won Kim "Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of β -Carotene in *E. coli*" Journal of Biotechnology (2009); 140: 218-226
- Sofia Fredriksson, Klas Elwinger, Jana Pickova "Fatty acid and carotenoid

composition of egg yolk as an effect of microalgae addition to feed formula for laying hens” Food Chemistry (2005); 99: 530-537

Yogendra Shastri, Alan Hansen, Luis Rodríguez, K.C. Ting “Development and application of BioFeed model for optimization of herbaceous biomass feedstock production” Biomass and Bioenergy (2011); 35: 2961-2974

Yuxia Sun, Liang Sun, Fei Shang, Guoliang Yana “Enhanced production of β -Carotene in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by inverse metabolic engineering with supplementation of unsaturated fatty acids” Process Biochemistry (2016); 51: 568-577

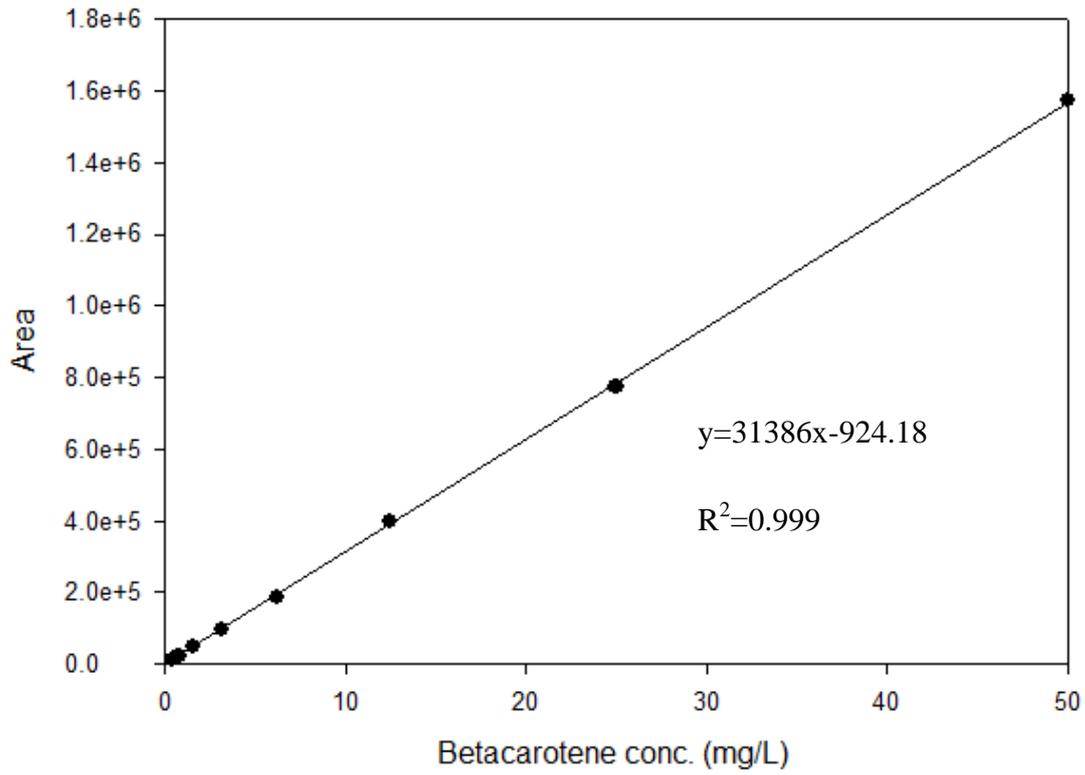
Yu-Ichi Yamane, Katsuya Higashida, Yutakanakashimada, Toshihide Kakizono, And Naomichi Nishio “Influence of Oxygen and Glucose on Primary Metabolism and Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Batch and Fed-Batch Cultures: Kinetic and Stoichiometric Analysis” Applied and Environmental Microbiology (1997); 63: 4471-4478

Zhiping Zhang, Xu Zhang, Tianwei Tan “Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/ high temperature and dark/ low temperature cultivation” Bioresour. Technol. (2014); 157: 149-153

附錄

附錄 A

β-胡蘿蔔素檢量線

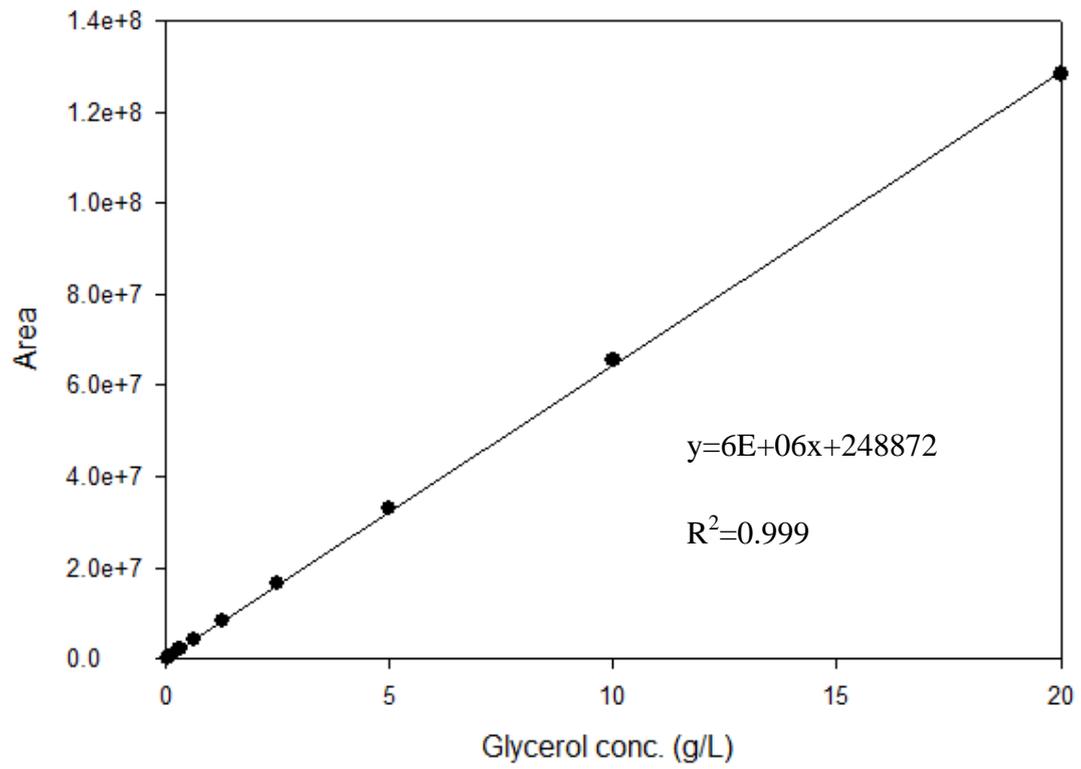


β-carotene 標準檢量線方程式：

$$\beta\text{-carotene conc.} = (\text{Peak area} + 924.18) / 31386$$

附錄 B

甘油檢量線



Glycerol 標準檢量線方程式：

$$\text{Glycerol conc.} = (\text{Peak area} - 248872) / 600000$$

附錄 C

HPLC 圖譜 β -胡蘿蔔素標準品

D-2000Elite: HORM

Series: 1075

Report: original

System: Sys 1

D-2000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 2016/04/01 07:34 下午

Reported: 2016/07/12 01:17 上午

Processed: 2016/04/01 07:54 下午

Data Path: C:\WIN32APP\D2000HSM\HORM\DATA\1075\

Processing Method: beta-carotene

System(acquisition): Sys 1

Series: 1075

Application: HORM

Vial Number: 4

Sample Name: betacarotene 標準品

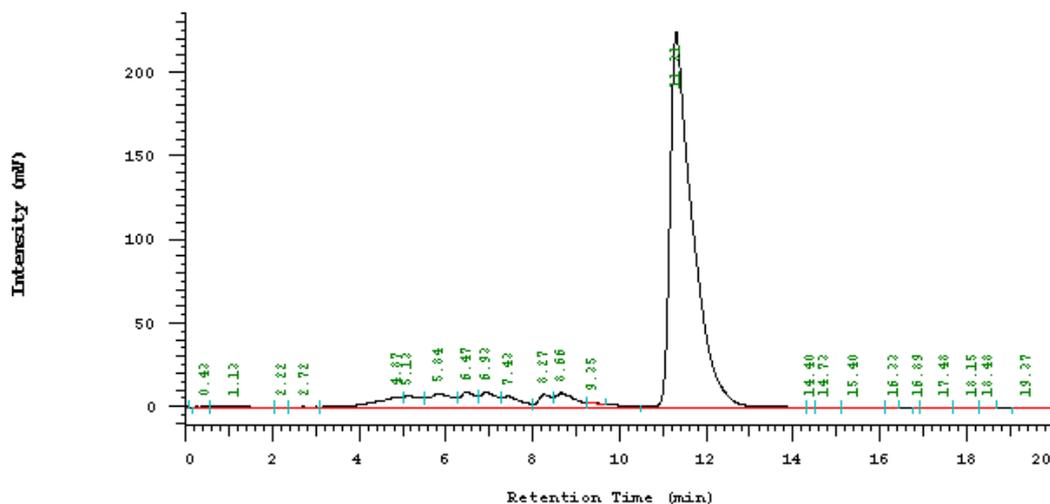
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 20.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



HPLC 圖譜 β -胡蘿蔔素樣品(固態培養)

D-2000 Elite: HORM

Series: 1060

Report: original

System: Sys 1

D-2000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 2015/12/13 01:51 上午

Reported: 2016/07/12 01:23 上午

Processed: 2015/12/13 02:11 上午

Data Path: C:\WIN32APP\D2000HSM\HORM\DATA\1060\

Processing Method: beta-carotene

System(acquisition): Sys 1

Series: 1060

Application: HORM

Vial Number: 19

Sample Name: UNKNOWN019

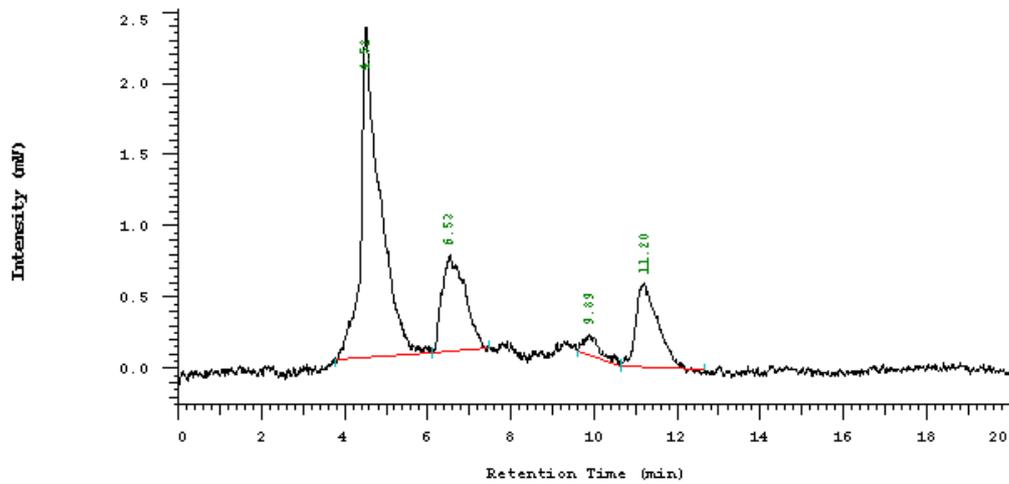
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 20.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



HPLC 圖譜 β -胡蘿蔔素樣品(液態培養)

D-2000 Elite: HORM

Series: 1090

Report: original

System: Sys 1

D-2000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 2016/06/20 10:25 下午

Reported: 2016/07/12 01:25 上午

Processed: 2016/06/20 10:45 下午

Data Path: C:\WIN32APP\D2000HSM\HORM\DATA\1090\

Processing Method: beta-carotene

System(acquisition): Sys 1

Series: 1090

Application: HORM

Vial Number: 13

Sample Name: 軟棕櫚油 2.5% 159hr

Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 20.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

