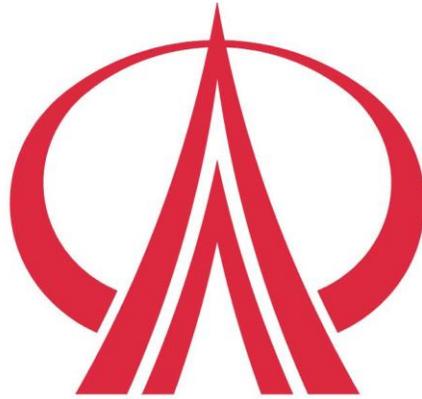


# 化學工程與生物科技系 實務專題論文

生質能源-小球藻醱酵



指導老師：陳志義

班級	學號	姓名
四化四乙	BP95068	王尹鈴
四化四乙	BP95103	黃柏霖

修平技術學院

中華民國 98 年 12 月 30 日

# 目 錄

## 第一章緒論

1-1前言	1
1-2實驗目的	2

## 第二章文獻回顧

2-1藻類簡介	3
2-1-1光合作用	4
2-1-2影響藻類生長的因子	7
2-2藻類生長方式介紹	11
2-3藻類培養系統介紹	13
2-4藻類培養策略介紹	15

## 第三章實驗材料與方法

3-1藻種	17
3-2培養基組成	18
3-3實驗步驟與流程圖	21
3-4實驗分析方法	23
3-5 藻菌發酵圖解說	23

## 第四章實驗結果與討論

4-1 醱酵時間影響	25
------------	----

## 第五章結論

5-1 結論.....	28
參考文獻.....	29

# 第一章 緒論

## 1-1 前言

自十八世紀的工業革命開始，人類就使用石油當作動力來源，從此石油成為人類生活不可或缺的能源之一。石油主要是經由古代動物、植物的遺骸經過泥沙覆蓋，受高壓與高溫作用而成。由於各項科技的蓬勃發展，石油更是被大量使用。但是地球蘊藏的石油是有限的，科學家預估四十年後石油可能耗盡。近年來，由於石油資源短缺，價格逐漸高漲；加上「京都議定書」的通過，全球對於溫室氣體排放問題更是重視，因此發展出代替石化燃料的替代能源是刻不容緩的事情。現階段許多國家都著手於替代能源的發展上，因不同地理環境、氣候、政策等等，所以適合不同國家的替代能源種類並不相同。目前已發展的替代能源包括火力發電、水力發電、風力發電、海洋溫差，太陽能與生質能源等。

生質體(biomass)是指以生物(動物、植物及微生物)為來源之有機體，由生質體所轉換得到的能源稱之為生質能源(bioenergy)。植物接受太陽光照射，進行光合作用以生產有機物質，進而可轉化成生質能源。由於陽光可視為無限供應的能源，只要有植物，就有不斷的有機物質產生，即有不斷的生質能源，所以生質能源可以說是取之不盡、用之不竭，謂之為可再生能源。因為植物行光合作用進行生長時，其過程是吸收空氣中的二氧化碳形成有機物質，並且生質能源使用後所產生的二氧化碳並不會超過植物行光合作用所需的二氧化碳，所以並不會增加大

氣中二氧化碳的含量。所以生質能源可以說是最乾淨的綠色能源。由於生質能源具有可再生性以及沒有二氧化碳淨排放量的優點，因此可以說是絕佳的替代能源。

目前生質能源大致上可分成生質柴油、生質酒精，生質氫氣等三大類。其中生質柴油因為具有較高的十六烷值（Cetane Number），相對於石化柴油燃燒較為完全；閃火點（Flash point）較高，較不容易意外點燃而失火；與石化柴油的混合性良好。因此生質柴油可以說是相當具有潛力的生質能源。現階段的生質柴油大部分是從植物轉化而來，但是栽種的時間過長，造成經濟效益過低。有部份的生質柴油是經由烹飪後的廢油轉化而來，但是廢油的品質良窳不齊。有許多文獻指出有些微藻（microalgae）經光合作用固定二氧化碳，轉化成化合物且更進一步以油脂形式大量儲存於體內。而且微藻的培養時間較短，收成次數較多，品質也較為穩定。以美國為例，經由評估培養微藻來生產生質柴油，只需要 2% ~ 6 % 的現今農作土地面積即可完全取代交通運輸所需要的燃料。因此微藻可以說是相當有潛力的生質柴油來源。

## 1-2 實驗目的

由小球藻菌醱酵後，萃取大量藻油與利用醱酵過程中減少 CO<sub>2</sub> 廢氣，提供天然之生質能源。

## 第二章 文獻回顧

### 2-1 藻類簡介

藻類是最原始的植物，根據化石遺跡推斷，距今三十五億年前就出現在地球上。藻類屬於真核細胞，無根、莖、葉分化，含有葉綠素及其他輔助色素，可捕捉太陽能，進行光合作用。藻類的種類繁多，目前已知大約有三萬多種，依照其構造型態、色素種類、儲存物質等分類，可以分成藍藻門(Cyanophyta)、原綠藻門(Prochlorophyta)、綠藻門(Chlorophyta)、輪藻門(Charophyta)、裸藻門(Euglenophyta)、褐藻門(Phaeophyta)、金藻門(Chrysophyta)、甲藻門(Pyrrhophyta)、隱藻門(Cryptophyta)與紅藻門(Rhoophyta)等十大植物門。藻類的分佈很廣，從水域到陸地都有其蹤影，有底棲或著生的大型藻，如綠藻、褐藻、紅藻等，這些大型的藻類通稱為「海藻」。海洋中的藻類大多數是屬於漂浮在水中的微藻類，大部分為單細胞、群體或絲狀，其體型從幾微米到 200 微米( $\mu\text{m}$ )，必須藉由高倍顯微鏡才能看清楚。

藻類對於人類的生活息息相關，可應用於許多領域。近年來發現有些微藻含有豐富的多元不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid, PUFA)，如二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)與二十二碳六烯酸(docosahexanoic acid, DHA)等，其可以當作人類的健康食品。目前綠藻(Chlorella)及螺旋藻(Spirelina)已廣泛被大量培養做為保健食品。

由於藻類具有高光合作用能力，可利用火力發電廠排出的煙道氣，吸收其中的二氧化碳以提供生長，達到減少廢氣的排放量。

### 2-1-1 光合作用 (Photosynthesis)

光合作用係指利用光進行合成反應的現象，包括所有利用光的化學反應；但現今大部分統稱光合作用是植物利用光能將無機的二氧化碳和水轉變成有機物質，又可稱為碳素同化作用(carbon assimilation)。

光合作用由兩個反應所組成，分別是光反應(light reaction)及暗反應(dark reaction)，如圖2-1 所示。光反應發生於葉綠體的類囊體膜(thylakoid membrane)上，將光能轉化成化學能，還原 $\text{NADP}^+$ 成 $\text{NADPH}_2$ 以及產生高能量化合物ATP；暗反應發生於基質(stroma)中利用光反應形成的 $\text{NADPH}_2$ 與ATP將二氧化碳轉變成碳水化合物。

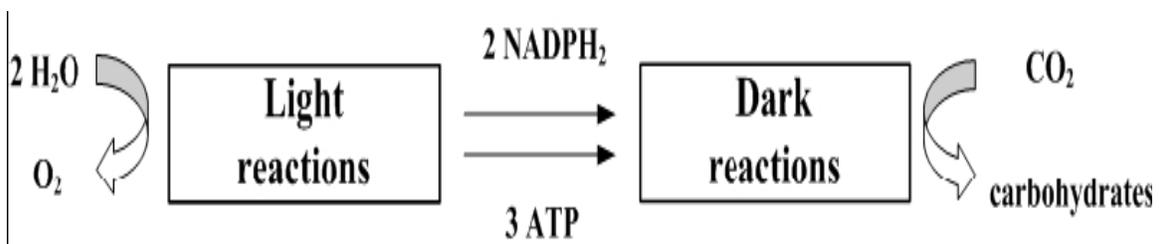


圖 2-1 光合作用之光反應與暗反應示意圖

光反應由兩個系統串聯而成，先發生光系統 II (photosystem II, PS II) 然後再發生光系統 I (photosystem I, PS I)，如圖2-2 所示。PS II 係指由葉綠素和其它色素吸收光能，將光能傳遞到PS II 的反應中心 P680，引起光化學反應，將水氧化釋放電子，而轉化成氧氣；

PS I 係指經一連串電子傳遞過程，將 $\text{NADP}^+$  還原成 $\text{NADPH}_2$ 。PS I 和 PS II 所引起的一連串電子傳遞造成類囊體膜內外氫離子的濃度梯度，使ADP 進行光磷酸化 (photophosphorylation)反應生成 ATP 。

暗反應是經由卡爾文循環(Calvin cycle)，利用從光反應所產生之 ATP及  $\text{NADPH}_2$  將二氧化碳固定，透過體內代謝途徑轉化成碳水化合物。暗反應必須要有ATP 及  $\text{NADPH}_2$  的供應才能發生，不需要光也可進行，但是沒有光就不能驅動光反應的進行，暗反應就不會進行，因此光反應與暗反應並不會個別發生，而是伴隨進行的。

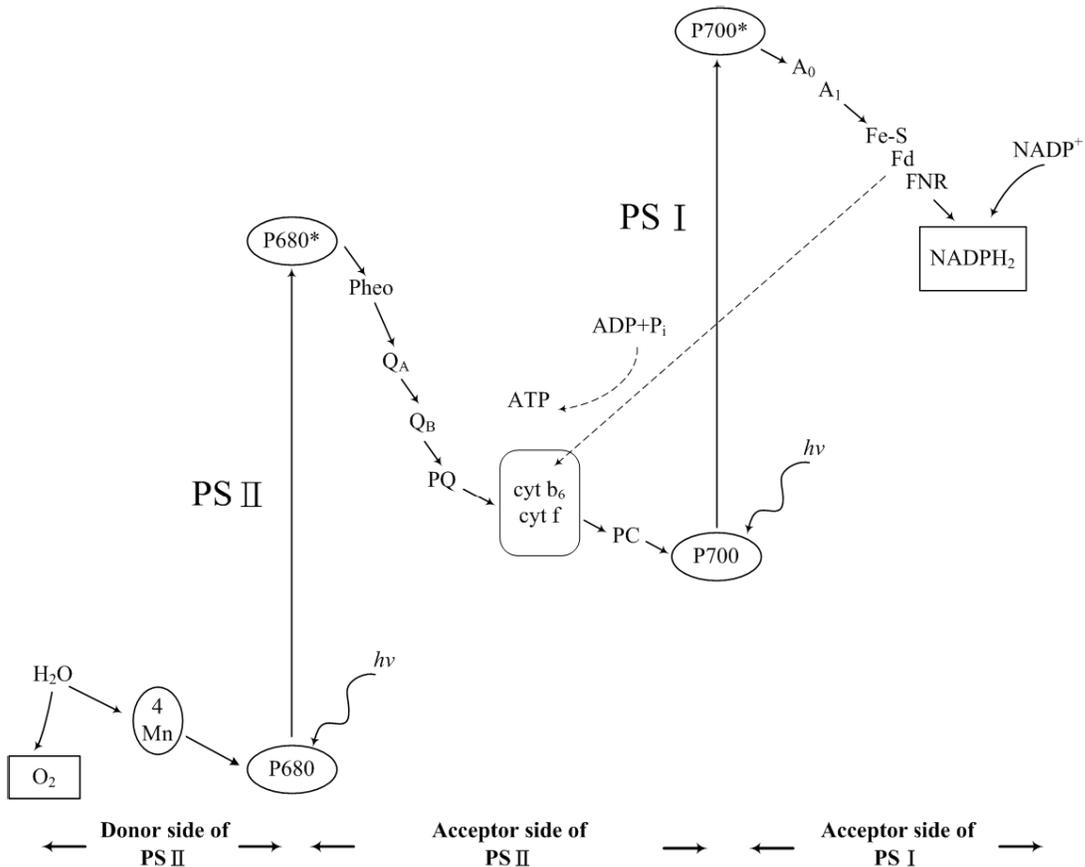


圖 2-2 光合作用之光反應電子傳遞途徑示意圖

光合作用必須要有光才能進行反應，而光合作用的效率隨著光強度不同會產生變化，如圖2-3 所示，可以分成三個區域，分別是光限制區(light limitation)、光飽和區(light saturation)、光抑制區(light inhibition)。當光照強度較弱時，光合效率值隨著光照強度增加呈線性關係增加，此為光限制區。當光照強度持續增加，光合效率增加率逐漸降低，最後，增加到某一光照強度以後，光合效率會到達最大值並呈持平狀態，此光照強度稱為光飽和強度(light saturation intensity,  $I_s$ )。此時光合效率值與光強度無關，此為光飽和區。當光照強度再持續增加，過強的光能會傷害到光反應中的PS II，光合效率會隨著光照強度增加而降低，此為光抑制區域。

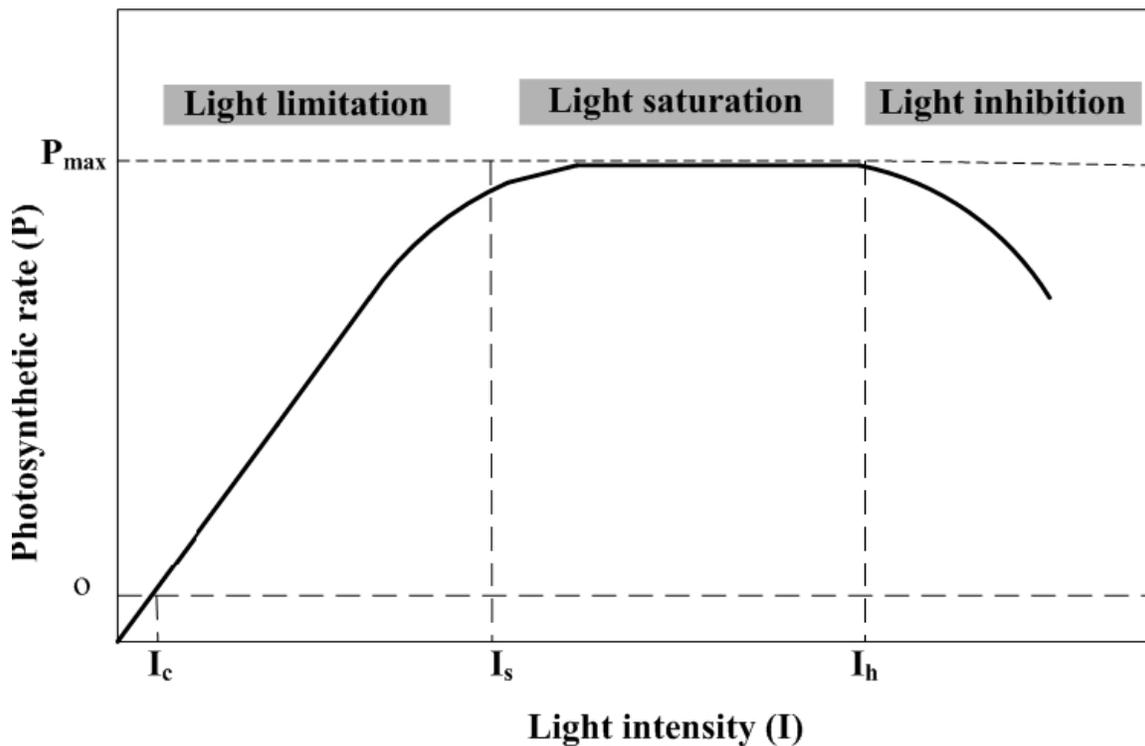


圖 2-3 光合作用效率與光照強度關係圖

## 2-1-2 影響藻類生長的因子

由於藻類必須吸收光來進行光合作用進而生長，所以其最主要的生長限制因子為光。其次，二氧化碳為藻類進行光合作用不可或缺的物質，因此對於藻類生長也具有相當的重要性。文獻上也指出，因為混合效果會引響到藻類受光的亮暗頻率，進而影響到其生長。

以下將分別介紹光、二氧化碳、混合效果對於藻類的影響。

### 一、光

由於光是藻類生長的主要限制因子，所以了解光的基本性質在培養藻類上是有其必要性的。光在介質中傳播時，有一部份能量會介質被吸收然後轉換為熱能，此現象稱為光的吸收性質。此外，還有一部分能量被介質中的質點散射到四面八方去，此現象稱為光的散射性質。以下就分別介紹光的吸收及散射性質。

光線通過均勻的透明介質(如玻璃、清水)時，從側面是難以看到光線的。如果介質不均勻，像是有懸浮微粒的混濁液體，便可以從側面清晰看到光束的軌跡，這是因為介質中的密度分佈不均勻，如煙(氣體中飄浮著固體微粒)、霧(氣體中飄浮著液體微粒)、懸浮液(液體中懸浮著許多固體微粒)、乳狀液(彼此兩種不互溶的液體混合液)，使得光線在傳播的過程中便有一部分離開原來傳播的方向，往別的方向傳播，此現象就稱為光的散射。研究中將應用光在空氣中傳播會產生散射現象，設計新型光生化反應器。

對於光的一些性質有基本的了解以後，下面就分別介紹光對於藻類生長的一些影響因素。

### (1) 光照強度：

可見光的波長介於380-750nm。但是藻類並不能完全吸收全波長的光來進行光合作用，只能吸收相當接近可見光的波長400-750nm的光進行光合作用，此波長範圍的光就稱為光合作用有效輻射 (photosynthetically active radiation, PAR)。對於光自營性生長的藻類，需要充足的光照以行光合作用，然而光照太強卻會抑制其生長。藻類的光合效率與光照強度之關係如圖2-3 所示。

### (2) 光照路徑：

在藻類培養系統中，光線所通過的路徑稱之光徑 (light-path)。根據文獻，光照強度隨著藻類濃度及光徑長度增加而以指數關係逐漸衰減，通常以Lambert-Beer's Law 來模擬此現象。當培養系統的光徑太長時，使得光線無法穿透全部藻液，造成部份區域完全沒有光線照射。或者隨著培養時間增加，藻類濃度上升，藻類彼此間會互相遮蔽光線 (mutual shading)，使得光線較難穿透藻液，只能照射到部份藻液。藻類培養系統因此可分成兩區域，光線可到達的區域，稱為光區，在此區域藻類可進行光合作用，而光線無法到達的區域稱為暗區，在此區域藻類幾乎沒有光線可以利用，因此沒有光合作用發生。

通常光區所佔培養統的比例相當小，舉例來說，入射光強度為  $500 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  照射在濃度為  $1 \text{ g/L}$  的 *Englena gracili* 培養系統中，光線僅能到達光徑約  $2\text{cm}$  的範圍內，光分佈的情形如圖2-5 所示。

光徑長度對於藻類的生長具有重要的意義。以平板反應器來說，Ning Zouc 和 Richmond 等人將 *Nannochloropsis* 培養於不同光徑長度的平板反應器下進行研究，在光徑較短的反应器，藻類可以充分受到光照，所以濃度較高，但是培養體積較低，藻類產量並不高，反而是在中間長度光徑有最高的產量。代表在此光徑長度下，藻類具有最佳的光使用效率，而此光徑長度就稱為最適光徑(optimal light-path)。

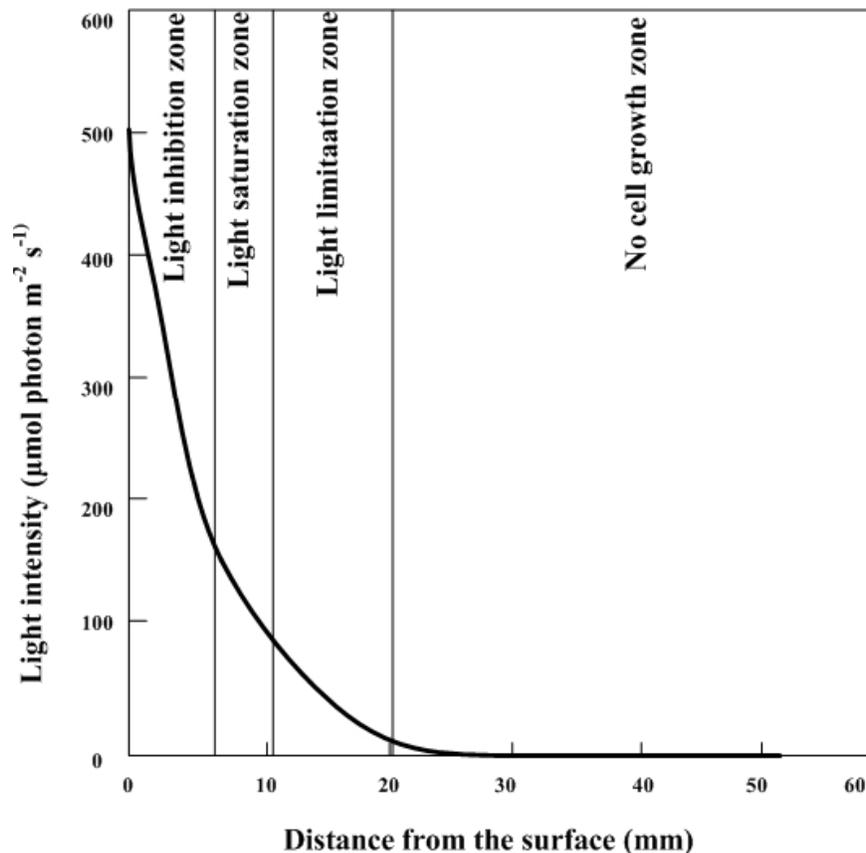


圖2-5 光強度  $500 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  照射濃度  $1 \text{ g/L}$  *Englena gracili* 於反應器內光分佈情形

### (3) 光條件(light condition) :

由於光是影響藻類生長的最主要因子，因此了解光在反應器中的情形，將可以得知光生化反應器效能的優劣。

入射光強度(incident light intensity)長久以來被用來表示反應器內光的條件，但是此表示方式只有在藻類濃度低時以及在光徑非常小的反應器內才有意義。因為只有在此情形下，藻類遮蔽光效應可忽略，故入射光強度與穿透藻液後剩餘的光強度幾乎相等，代表著每個藻類細胞都吸收到同樣的入射光強度。

由於用入射光強度表示反應器內光的條件，只適用於特定情況下，所以利用入射光強度來評估反應器內受光的條件並不是個好的依據。

## 二、二氧化碳

根據文獻，藻類體內約含有 40-50%的碳，若是要生成 1 公斤的藻類細胞，需要約 1.5-2.0 公斤的二氧化碳以供生長代謝，故碳對於藻類的重要性可見一般。就自營藻類來說，能利用無機碳源進行生長。

溶於水中的無機碳源，包含 $\text{CO}_2$ 、 $\text{H}_2\text{CO}_3$ ， $\text{HCO}_3^-$ 與 $\text{CO}_3^{2-}$ 型態。 $\text{H}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 無法被藻類利用， $\text{HCO}_3^-$ 的利用則因藻種和環境條件而異，最常見的例子就是*Spirulina* 可利用 $\text{HCO}_3^-$ 當做碳源來生長， $\text{CO}_2$ 則是藻類最普遍也是最通用的碳源。

CO<sub>2</sub> 佔空氣的0.03 % (v/v)，而且CO<sub>2</sub>又不易溶解於中，當藻類培養於高濃度的時候，所需碳源也逐漸增加。所以在藻類培養系統中，常用純CO<sub>2</sub> 與空氣混合(CO<sub>2</sub>-enriched air)來提供藻類充足的碳源，使得光為藻類生長的唯一限制因子，同時也可控制培養系統的pH值。

### 三、混合效果

在藻類培養系統中，其混合擾動(mixing)程度，對於生產高濃度藻類扮演著重要角色。因為藻類在光照下進行光合作用，而在非光照下，進行呼吸作用。因此光照的亮暗週期，影響光合作用和呼吸作用的比例，對於藻類生長有很大的影響。因此提升藻類培養系統的混合擾動程度，可使藻類細胞快速往復地來回光區與暗區之間，增加光照的亮暗頻率，提升藻類的光合效率值。

### 2-2 藻類生長方式介紹

藻類的生長以碳源種類及光源需要與否，可分成三種生長方式。分別是光自營(photoautotrophy)、異營(heterotrophy)及混營(mixotrophy)。

自營生長是利用無機碳源(主要是二氧化碳)，經由陽光照射以進行光合作用。因為二氧化碳及陽光都可從大自然獲得，所以其培養成本較低。由於幾乎所有藻類都可以行自營生長，因此目前全世界大規模藻類培養都是以自營為主。因為光對於自營藻類為重要的生長因子，所以在光生

化反應器設計方面，如何增加光能的使用效率是個重要關鍵。

Joerg Degen等人曾在氣舉式光生化反應器內放置檔板，利用此裝置造成藻類的特定流動路徑。使得藻類間接性反覆受光照以提升光使用效率，其產率是無放置檔板的氣泡塔的 1.7 倍。

Hu Qiang等人隨著不同的節，將平板反應器傾斜不同角度。藉由角度的不同，控制陽光照射到反應器量，發現藉由此方式可提升原本年產量的 35 %。

Masahiko Morita 等人亦在錐形反應器的不同圓錐角度下實驗，發現角度60度時，有最大的藻類產量，即有最佳的光使用效率。當角度逐漸增加到180度時，此時為板型反應器，產率最小。由此可知，經由調節光生化反應器內的受光環境，可間接影響藻類的生長。

異營生長是利用有機碳當作碳源，大部分是醋酸或是葡萄糖，可在黑暗的環境下利用有機碳源生長代謝，不需要光照亦可生長。在黑暗環境下，藻類依舊能合成光合作用所需要的色素如葉綠素等，只是含量較光自營藻類低。藻類在生物反應器內進行異營生長，由於較容易控制培養條件，而且不受到藻類互相遮光效應的影響，所以培養的濃度可以達到相當高( 20~100g L<sup>-1</sup>)。例如Endo等人成功將*Chlorella*進行異營培，Chen與Johns等人將*Chlamydomonas*進行異營培養，得到高濃度的藻類可以佐證。但是並不是所有藻類都可進行異營生長，而且在異營培養的環下，藻類體內的化學成分通常會改變。並且需要額外添加碳源，成本相對較自營培養高，通常用來生產較高單價的化合物(DHA、EPA)。混營生長又稱為光異營生長(photoheterotrophic growth)，顧名思義就是藻類可以利用有機碳源並且同時進行光合作用。

一般都是在戶外培養。某些藻類在特定的培養條件下，自營及異營可以同時進行作用並且不受彼此影響，所以混營培養藻類的生長速率與濃度是自營及混營培養獨立操作下的總和。一般來說，混營培養的最大比生長速率會大於異營，而異營培養又小於自營。由於混營培養也需要額外添加碳源，所需的成本也相對自營培養較高。有些藻類 (*Chlorella*) 在提供光源的培養條件下，其利用有機碳源(葡萄糖)的能力將會被抑制，所以並不是所有藻類都可適用於混營培養。由於此研究是藉由培養油質性微藻，以當作生質柴油的來源。培養微藻來生產生質柴油如欲要與現今的石化柴油競爭，必須要具備培養成本低廉的條件。因此，研究中培養的藻類為自營生長的油質性微藻 *Nanochloropsis oculata*，使得生產成本降低。

### 2-3 藻類培養系統介紹

藻類培養系統可分成開放式和密閉式系統。選擇培養系統需要考慮許多因素，諸如藻類的生物特性、土地成本、人工成本、能源成本、用水成本、營養源成本，氣候狀況與目標產物種類等。

#### (1) 開放式藻類培養系統：

開放式系統大致上有四種型態，分別是大型淺池、開放式槽體，圓形培養池及跑道型培養池。每種類型都有其優缺點，必須依據培養藻類的特性及土地成本等條件作為選擇的依據。

例如，澳洲Betatene 公司以面積 250 公頃的開放式大型淺池培養 *Dunaliellasalina*，完全不用機器混合裝置，只靠空氣流動來做混合。

以上培養方式必須配合在當地的土地、海水運輸成本低廉且氣候接近於藻類生長條件，以至於可以全年培養藻類。另一個培養相同藻類的例子是在以色列，以跑道式培養池培養 *Dunaliella salina*，並且裝設輪板裝置(paddle-wheel)進行混合攪拌。因為該地的土地成本較高，所以必須提高單位土地的面積產率以降低成本。使用攪拌裝置可以增加混合效果，使得藻類的光使用效率上升，提高細胞濃度。

由上述二例可看出，要視不同條件須選用不同培養方式，方能獲得最大經濟效益。開放式系統可用於自營或混營培養，而且大部分在戶外培養。由於是利用陽光當作光源，故所需的成本較低，並且比較容易規模放大，因此現今商業化大規模培養藻類幾乎都採用開放式系統。但是其缺點包含培養環境條件變化過大，例如溫度、天氣、光照強度及光照週期隨著季節不同而變化，容易遭受其它藻種、細菌及原生動物污染以及二氧化碳容易逸散，水分揮發嚴重等。因為開放式培養的環境因子較不容易控制，所以培養藻類的濃度與產率通常不高。而且開放式培養系統較容易遭受污染，不僅會造成藻類濃度變低、產率下降，污染嚴重的話，甚至會造成藻類死亡，所以如何避免污染是開放式系統必需克服的問題。現今已商業化大規模培養的藻類中，都具有對培養環境的高選擇性，可以在開放式系統生長而避免污染。如 *Chlorella* 培養於富營養源的環境、*Spirulina* 培養於高pH值及 *Dunaliella salina* 培養於高鹽度的環境。

## (2)密閉式藻類培養系統：

密閉式系統大致可分成發酵槽、培養袋，平板光生化反應器及管型光生化反應器。隨著不同的應用，培養藻類所選用的密閉式系統也有不同。舉例來說，發酵槽系統的設計及操作方式較簡單且普遍被了解，主要是用於培養異營生長的藻類。塑膠培養袋設備較簡單而且成本便宜，藻類培養於其中，目前已被廣泛應用於水產養殖業中。平板與管型光生化反應器被早在五十多年前就開始被研究，是最常見的密閉式藻類培養系統。

兩種類型反應器都具有相同的特點，那就是縮短光徑使得每個藻類細胞能吸收到較充足的光，即有較大的光照面積與培養體積比 (surface-to-volume ratio)。密閉式系統可用於自營、異營或混營培養，而且在戶內或戶外都可實施。密閉式系統較容易控制培養環境條件，使得培養系統較穩定，產率較高以及品質較穩定，可減少後續分離純化所花費的成本。其亦較不容易被雜菌污染，幾乎所有的藻類都可適用等優點，但是卻有設備成本過高，規模放大不容易等缺點。所以密閉培養系統大部分用來生產高單價的化合物，如蝦紅素、類胡蘿蔔素、EPA、DHA 等。

## 2-4 藻類培養策略介紹

藻類培養於生物反應器中，其培養策略一般可分成批次培養 (batch culture)、饋料批次培養 (fed-batch culture)，連續式培養 (continuous culture) 與半連續式培養 (semi-continuous culture)。

## (1) 批次培養

批次培養是早期微生物培養就採用的方式，也是其他培養操作方式的基礎。生物體培養於一定體積的培養基中，在培養過程中，體積維持不變，不添加額外的培養基。隨著生物細胞的增加而營養源逐漸減少，細胞及產物會生長累積到一定濃度，最後再一次收穫細胞、產物及培養基。此種培養策略最大的缺點可能有產物抑制(end product inhibition)現象發生，可是因為具有操作簡單、培養週期短、容易規模放大等特點，所以常應用於工業上。

## (2) 饋料批次培養

饋料批次培養是改良批次培養而成。在一開始培養時，以不超過總工作體積的培養液進行培養，隨著時間增加，細胞逐漸的增加而營養源不斷被消耗，於營養源不足時，開始連續式或間歇式進料營養物質，使得細胞持續生長到較高的濃度或產物累積到較高的水平。整個培養過程中，只有進料，完全沒有流出或回收細胞、產物及培養基。此種培養策略受到反應器操作體積的限制，培養週期通常較不長。

## (3) 連續式培養

連續式培養是在批次培養時，以一定速率向生物反應器添加新鮮的培養基，同時也以相同的速率排出細胞的培養液，達到進料等於

出料的一種穩定狀態(steady-state)。此種培養策略其反應器內培養狀態可以達到穩定，細胞在穩定的狀態下生長，並且其代謝產生的有害物質也會被稀釋帶出，理論上，培養過程可穩定的延續下去。

#### (4) 半連續式培養

半連續培養又可稱為重複批次培養(repeated fed-batch culture)。半連續式培養是在批次培養時，每間隔一段時間，排出部分的細胞培養液，剩餘的培養液可當作種源，然後再添加新鮮的培養基補充到原有的操作體積，繼續培養。此種培養策略可縮短細胞遲滯期(lag phase)的時間、持續維持細胞的指數生長狀態、培養時間較長、可多次收穫、無須重複清洗反應器及消毒等繁複的操作。半連續式培養的產率計算方式如下所示。

$$\text{產率} = \frac{\text{最後系統內的細胞生質重} + \text{總共排出的細胞生質重}}{\text{最後系統內的培養體積} \times \text{培養的時間}}$$

### 第三章 實驗材料與方法

#### 3-1 藻種

本實驗所使用的藻種為擬球藻(*Nannochloropsis oculata*)。此藻先前在日本稱之為海產綠球藻 (marine *Chlorella*)，1986年始經日本筑波大學千原光雄等定名為 *Nannochloropsis oculata*。擬球藻在分類學上屬於：植物界 ( Kingdom Plantae )、金藻門 (Chrysophycophyta)、真眼點藻綱(Eustigmatophyceae)、真眼點藻目(Eustigmatales)、單珠藻科(Monodopsidaceae)、擬球藻屬 (*Nannochloropsis*)。擬球藻之細胞為小球體，直徑為 2-4 微米，無鞭毛，無眼點，外觀與綠球藻(*Chlorella*)極相似，如圖3-1，故稱之為擬球藻。其細胞分裂時產生兩個子細胞，不產生動孢子，僅含葉綠素。其主要類胡蘿蔔素為violaxanthin及vaucheriaxanthin ester，所以藻色呈現綠色或黃綠色(培養老化時較明顯)。以及具有尿素分解酵素，故其可分解尿素而取得氮源。並且在適當的培養條件下，體內油脂含量可高達63%，後續當作生質柴油的來源，具有相當的潛力。

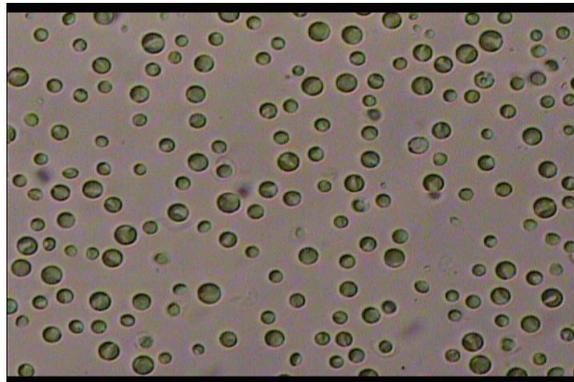


圖 3-1 *Nannochloropsis oculata* 於光學顯微鏡圖(100X)

### 3-2 培養基組成

本實驗以Walne's medium 當作藻類培養的營養成分，其組成分為四部分：

- (1) Nutrient solution：成分如表 3-1 所示，儲存於室溫。微量金屬元素溶液 (trace metal solution) 配方如表 3-2 所示。
- (2) Vitamin solution：如表 3-3 所示，儲存於 4 °C 冰箱。
- (3) Nitrogen source：將 100 克尿素溶解於 1 公升的去離子水中，儲存於4 °C 冰箱。
- (4) Sterilized seawater：將海水素（本實驗使用海水素的廠牌為 CORALIFE）溶於純水中，配製成濃度 35 g/L 的人工海水（此為正常情況下天然海水的濃度），之後置於高壓滅菌釜滅菌 20 分鐘，溫度為 121 °C、壓力為 1.2 kg/cm<sup>2</sup>，冷卻至室溫後使用。本實驗於接種 (inoculate) 時，於每公升人工海水中分別加入培養基的量為：Nutrient solution 1.0 mL、Nitrogen source 1.0 mL及Vitamin solution 0.1 mL。

表 3-1 Walne's Medium-Nutrient solution composition

Compound	per liter
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.3 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.36 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	33.6 g
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	45 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20 g
Trace metal solution	1 mL

表 3-2 Walne's Medium-Trace metal solution (TMS) composition

Compound	per 100 mL
$\text{ZnCl}_2$	2.1 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.0 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.9 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.0 g

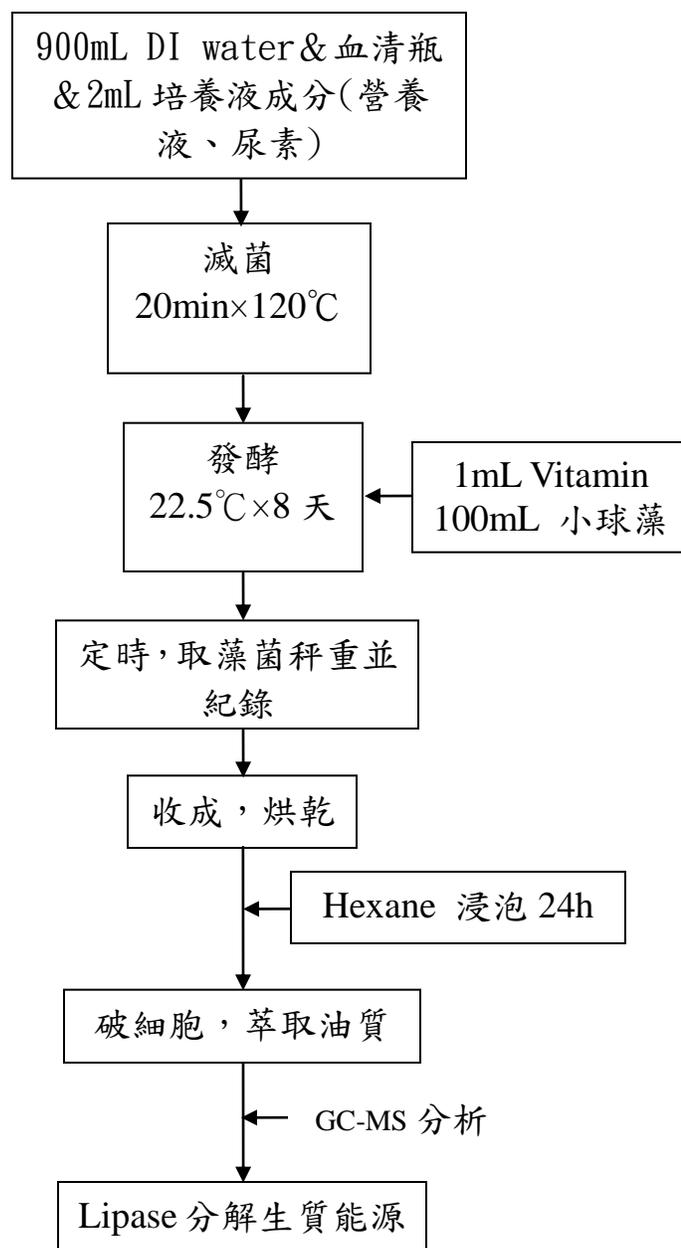
表 3-3 Walne's Medium-Vitamin solution composition

Compound	per liter
Cyanocobalamin	10.0 mg
Thiamine	10.0 mg
Biotin	200.0 $\mu$ g

### 3-3 實驗步驟與流程圖

#### 實驗步驟與操作 SOP:

1. 取一升的血清瓶用清潔劑清洗一遍，裝約 7~8 分滿(約 700 mL)放入超音波震盪氣震 15 分鐘，在用 DI water 清洗 3 遍。
2. 加入 900mL DI water 和各別加入 1mL Nutrient solution、1mL 尿素，放入高溫殺菌釜約 20 分鐘滅菌後拿出放在無菌操作台等降溫至室溫(30°C)。
3. 加入 1mL Vitamin 液 和 100mL(為保存菌種) 前培養綠藻，放入培養箱培養(約 7~8 天)。
4. 拿出血清瓶用 0.2 $\mu$ m 的過濾紙過濾出藍綠藻生成物。稱重並記錄之。
5. 取綠藻加入固定量 hexane 一天後，使用超音波振盪破細胞，取出油質萃取後，取油質用 lipase 生物分解轉質新油相，用 GC-MS 測量油相組成。



### 3-4 實驗分析方法

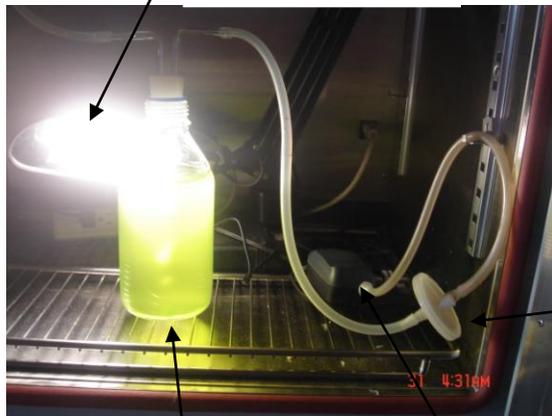
- 一、取藻液於分光光度計找出最大吸收波長，特徵波長位於 682 nm。
- 二、將分光光度設定於特定波長 682 nm，測量藻液的吸光值(optical density, OD)。

### 3-5 藻菌發酵圖解說



低溫培養箱  
目的:讓小球藻在適溫下成長

日光燈  
目的:提供光罩讓小球藻行光合作用



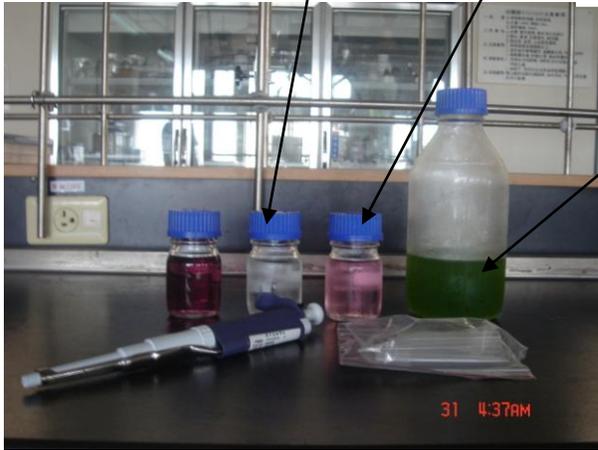
小球藻成長中

打氣泵浦  
目的:讓小球藻有足夠的 CO<sub>2</sub> 行光合作用

過濾網  
目的:隔絕空氣中的髒物質即細菌

尿素  
功用：營養劑  
目的：提供小球藻氮元

維他命  
功用：營養劑  
目的：提供小球藻營養



小球藻  
功用：前培保存菌種  
目的：為主培養的來源



## 第四章 結果與討論

### 4-1 醱酵時間影響：

天數	0	1	2	3	4	5	6	7	8
OD 值	0.19	0.22	0.27	0.32	0.36	0.38	0.39	0.40	0.36
	8	6	9	4	4	9	6	5	3
顏色									

#### (一) 小球藻發酵過程中大可分為：

1. 第一階段(從第 0-1 天)：為初成長期。由 100mL 前培養綠藻菌種，加上培養基；此階段培養基為豐富的，讓小球藻開始成長。
2. 第二階段(從第 2-7 天)：為小球藻茁壯成長期。此階段培養基會因為小球藻的成長而慢慢的減少中。
3. 第三階段(從第 8 天起)：慢慢的進入衰退期。此階段培養基已被小球藻消耗掉，因此小球藻無法持續生長而面臨死亡期。

如圖 4-1。

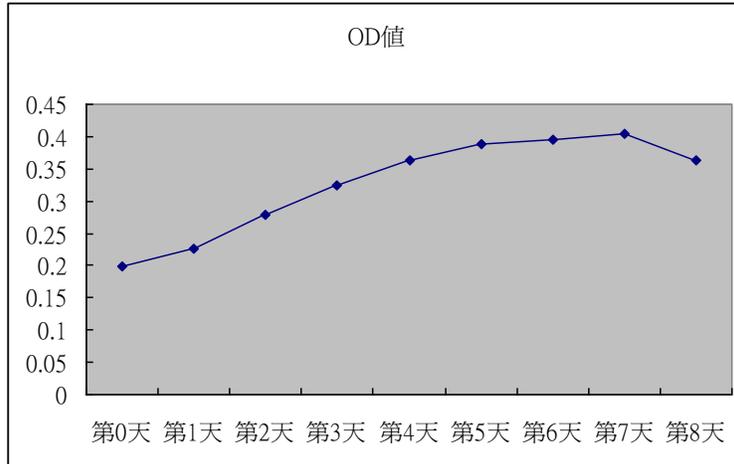


圖 4-1 醱酵時間影響

### (二) 小球藻醱酵之培養基改變影響：

小球藻所需的培養基為 Nutrient solution、Vitamin、尿素，改變其中一種培養基，就會使小球藻無法持續成長而死亡。

### (三) 小球藻醱酵之培養溫度改變影響：

小球藻所適應的溫度在於 22°C~25°C 之間，並不適合在高溫和低於 22°C 下成長否則小球藻將會無法持續生長而死亡，一定要保持在設定的溫度內培養。

由文獻知，在培養過程中要持續不斷的照光和 CO<sub>2</sub> 通入，因為光合作用必須要有光才能進行反應，所以讓小球藻在不同的角度下照到光線。藻類體內約含有 40-50% 的碳，即要生成 1 公斤的藻類細胞，需要約 1.5-2.0 公斤的二氧化碳以供生長代謝，故碳源補充對於小球藻類醱酵的重要性可見一般。

由此實驗可知在 1L 血清瓶中，小球藻發酵最佳成長期為七天左右，接著小球藻就會進入衰退期。當進入衰退期間也就表示所提供的培養基已被消耗完，這時可再加入培養基讓小球藻繼續成長，不過醱酵瓶內會受到已衰退死亡之小球藻影響，例如死亡小球藻菌體以產生惡臭及阻擋光線，這樣一來小球藻大約可再養3-4天。

## 第五章 結論

### 5-1 結論

以一升血清瓶為前培養容器，研究小球藻生長的過程及產出之小球藻量。由醱酵時間實驗得知，醱酵第 7 天時小球藻之量最多。

以 Walne's medium 當作藻類培養的營養成分，若改變任一種營養成分，則小球藻有不易生長情形發生。同樣，當醱酵溫度改變，小球藻則有不易生長情形。

## 參考文獻

1. **Connemann J, Fischer J.**, “Biodiesel quality Y2K and market experiences with FAME,” CEN/TC 19 Automotive Fuels Millennium Symposium, The Netherlands: Amsterdam, 25–26 Nov. 1999.
2. **Chisti Y.**, “ Biodiesel from microalgae”, *Biotechnology Advances* 25: 294–306. 2007
3. **Grima, EM, Perez JAS, Camacho FG, Sevilla JMF, Fernandez FGA.** “ Effect of growth rate on the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture”, *Applied Microbiology and Biotechnology* 41(1): 23–27. 1994.
4. **Watanabe Y, Saiki H.**,”Development of a photobioreactor incorporating *Chlorella* sp. for removal of CO<sub>2</sub> in stack gas”, *Energy Conversion and Management* 38: 499–503. 1997
5. **Moreira SM, Moreira-Santos M, Guilhermino L, Ribeiro R.**, “Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricornerutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability”, *Enzyme and Microbial Technology* 38: 135 – 141. 2006.
6. **Yean-Chang C.**, “Immobilized microalga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta, Chlorococcales) for long-term storage and for application for water quality control in fish culture”, *Aquaculture* 195: 71 – 80. 2001.
7. **Becker EW.**, “Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge” University Press. UK. p.1. 1994

8. 葉育才，光合作用 植物生產力的生理基礎，國立編譯館，p. 3. ，1979年。
9. **Masojidek J, Koblizek M, Torzillo G.**, “Photosynthesis in microalgae. In: Richmond A, editor. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology”, Blackwell Science. UK. p. 20-33. 2004
10. **Kirk JTO.**, “Light and photosynthesis in aquatic systems”, Cambridge University Press, Cambridge. 1994
11. **Lee YK, Low CS**, “Productivity of outdoor algal cultures in enclosed tubular photobioreactor”, Biotechnology and Bioengineering 40, p1119 - 1122, 1992
12. 趙凱華、鐘錫華，光學，北京大學出版社，p. 228-229、p. 249-251，2004年
13. 雷仕湛，光學新世界：非線性光學淺說，凡異出版社，p. 22-24、p145-146，1989年
14. 洪志瑞，油質性微藻培養於新型光生化反應器之研究，國立成功大學化學工程學系，碩士論文，2007年。