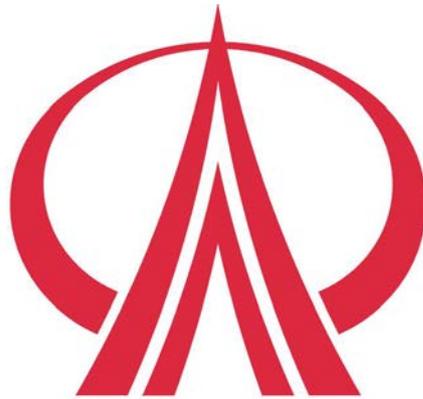


能源與材料科技系 實務專題論文

小球藻培養與固定化探討



指導老師：陳志義

班級：能材四乙 學號：BB100061 姓名：何志豪
班級：能材四乙 學號：BB100072 姓名：康智程
班級：能材四乙 學號：BB100074 姓名：許勝傑
班級：能材四乙 學號：BB100084 姓名：彭冠瑜
班級：能材四乙 學號：BB100501 姓名：江卉茵

修 平 科 技 大 學

中華民國 103 年 12 月 16 日

致謝

對於還沒開始做這個專題時，只知道現今的世界所需的的就是能永續發展的能源，因為石油是有限的，選擇小球藻的時候，是看到小球藻的穩定性高，培養的時間比較短，而這樣的特性能讓我們拿來培養發酵產生一種能源來使用，這種能源叫做生質柴油，這種替代的能源能大大的舒緩我們對於地球上永無止盡的需求，這段時間跟著陳志義老師找出小球藻最佳的保存條件，再經過培養復育，希望能找出最有效的保存方法。

感謝陳志義老師的從旁指導，以及遇到問題能陪我們找出解決方案，讓我們能順利完成這次的實驗。

摘要

小球藻構造簡單，行光合作用，油脂含量高，生長週期短…等特點。本研究目的是培養小球藻為開發有可行性的生質能源且達到二氧化碳減量，並同時生產附加價值高的生物化學品。由前人實驗結果已知最佳培養條件為：尿素 1mL、維他命 1mL、營養劑 1mL、海鹽 30g、溫度 23°C、日光燈 40W 照射下，一公升收集的小球藻為 0.923g，放大培養五公升收集的小球藻為 3.9g。

沿用上述小球藻之培養條件，再利用微藻固定化方法，配置各種海藻酸鈉及氯化鈣濃度溶液，將離心後的小球藻，加入海藻酸鈉溶液包埋微藻，將加入氯化鈣形成顆粒狀，保存於 4°C 下。從中探討固定化小球藻最佳培養條件之生命力，由實驗設計法得知配製 4.5%SA(海藻酸鈉)及藻菌數 50ml 為最佳固定化之方式。

目錄

第一章緒論.....	1
1.1 前言.....	1
1.2 研究目的與動機.....	3
第二章 文獻探討.....	4
2.1 藻類簡介.....	4
2.2 藻類生長方式介紹.....	11
2.3 影響生長的調控因子.....	13
2.4 藻類培養系統介紹.....	15
2.5 藻類收集.....	18
2.6 藻類轉換.....	21
第三章實驗及分析方法.....	25
3.1 儀器設備.....	25
3.2 藥品.....	26
3.3 小球藻培養.....	27
3.4 小球藻固定化.....	30
3.5 復育步驟.....	33

第四章結果與討論.....	35
4.1 小球藻的存放效果.....	35
4.2 固定化小球藻之長期保存效果.....	37
4.3 探討固定化影響因素.....	38
4.3.1 海藻酸鈉(SA)之影響.....	38
4.3.2 改變藻菌量之影響.....	40
4.3.3 藻菌量、海藻酸鈉(SA)同步改變之影響.....	41
4.4 小球藻固定化影響因素之綜合比較.....	43
第五章結論.....	44
第六章參考文獻.....	45

表目錄

表 1 各世代生質能源原料比較.....	2
表 2 各種藻類比較差異.....	10
表 3 藻油轉換生質能源之方式比較.....	22
表 4-1 小球藻保存在 4°C、4 個月的存放效果.....	36
表 4-2 固定化小球藻之長期保存效果.....	38
表 4-4 海藻酸鈉(SA)之保存時間影響.....	39
表 4-5 小球藻量之保存時間影響.....	41
表 4-6 增加藻菌量與海藻酸鈉(SA) 之保存時間影響.....	42

圖目錄

圖 2-1 光合作用之光反應電子傳遞途徑示意圖.....	10
圖 4-1 小球藻的存放效果.....	35
圖 4-2 固定化小球藻之長期保存效果.....	37
圖 4-4 海藻酸鈉(SA)之影響.....	39
圖 4-5 小球藻量之影響.....	40

第一章 緒論

1.1 前言

從工業大革命開始，人類就開始使用石油當作動力來源，而石油從此變成人類生活上不可或缺的能源，但石油並非取之不盡用之不竭，科學家初估石油再過 40 年後可能會耗盡。

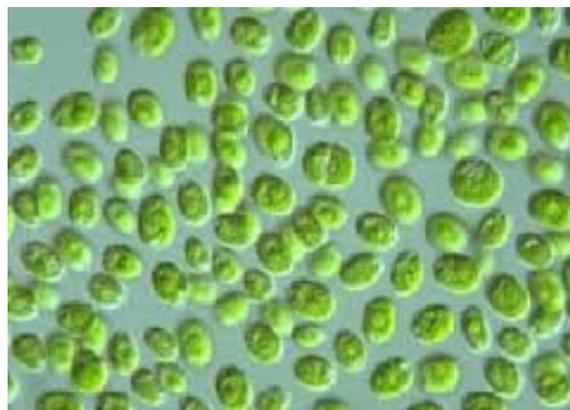
因此各國能源自主的政策下，尋求替代能源日益迫切，所以生質能的開發，成為國際關注的焦點，目前，所採用的生質能源原料，主要仍是集中於第一代的糧食發酵產生酒精與非糧食作物的生質柴油；第二代非糧食原料或都市廢棄物（如廢棄食用油等）製造酒精或柴油。

第一代原料由於與人或畜牧動物食用的作物爭地、造成國際糧食作物價格上揚，第二代非糧食原料希望能將廢棄的植物纖維素，轉化為能源，而原料仍是有栽植面積、原料不足、纖維素前處理成本過高的問題。因此除了持續研究開發能夠降低第一第二代生質能源生產成本的技術外，歐、美、日等國家也都積極的開發第三代生質能源料：藻類。藻類可說為低等的植物，通常為單細胞、絲狀體或者是片狀體，構造相當簡單，整個生物體都能夠進行光合作用，具有高光合效率、生長週期短的優點。

表 1 各世代生質能源原料比較

生質能源原料	環境影響	成本	缺點
第一代	與人生產糧食爭地	中	因爭地使糧食價格上漲
第二代	栽植面積不足	高	原料不足
第三代	不受限	低	收集、保存不易

我們現在使用生質體是以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，太陽光可視為無限供應的能源，只要利用植物的光合作用的特性，就有不斷的有機物質產生，即有不斷的生質能源，目前藻類的大小通常又可分為大藻及微藻，微藻為目前第三代生質能源主要的來源，較為常用的是小球藻及螺旋藻，小球藻的生長週期較短、油脂含量高、又可行光合作用等特色，且品質也較為穩定，也具有減碳之效果。且將藻類應用在生質柴油上，以取代石化柴油為目標的替代能源，利用化學轉脂化技術將類似的脂肪酸脂，產物可直接使用於柴油引擎上。但藻類生質燃料目前仍屬於發展中技術，具有極高產油量以及不與農爭地的優點，但因養殖與收穫成本過高，形成商業化的阻礙，但是隨著越來越多的研究計劃投入，在未來可望成為主要原料。



小球藻(Chlorella)屬於微藻，生長環境廣泛，在淡海水甚至土壤都可發現蹤跡，可依照環境進行自營及異營作用，生長體積小，收集

難度高，但為目前最廣應用為生質柴油的藻種。

培養小球藻為開發有可行性的生質能源且也能達到節能減碳之效果，並同時產生高附加價值的生質能源，但目前培養出的小球藻不易保存，因此此實驗的研究方向是使用小球藻固定化因在最佳培養條件生長的小球藻在低溫保存下只能維持一個月，一個月後球藻的生命例會逐漸下降取出的早由也相對減少造成無法商業化大量製造，因此未了能使小球藻能夠長時間在低溫 4°C 下保存其生命力，以便於提煉更大量的藻油，本實驗主要目的為小球藻固定化，也使生質能源能盡快替代即將耗盡的能源。

1.2 研究目的與動機

經學長姊多次實驗，已得知小球藻最佳培養條件，但是保存時間卻不宜超過 3 個月，因保存越久藻的生命力會越低(由墨綠色轉為黃色)，因此我們要利用固定化方式，為延長小球藻保存時間，本實驗將探討各種原料使用量對小球藻之保存時間影響，祈望藉由本實驗固定化方式，找尋出最佳保存方式。

文獻探討

2.1 藻類簡介

藻類在水裡非常常見，在陸域環境也是。但是在陸域藻類較不顯眼，且在潮濕、熱帶地區比乾燥地區更常見，因為藻類缺乏維管束和其他營陸地生活的適應構造。藻類在其他地點如雪地或以地衣的形式在裸露岩石表面與真菌共生。

藻類包括數種不同類以光合作用產生能量的生物，其中有屬於真核細胞的藻類，也有屬於原核細胞的藻類。它們一般被認為是簡單的植物，並且一些藻類與比較高等的植物有關。雖然其他藻類看似從藍綠藻得到光合作用的能力，但是在演化上有獨立的分支。所有藻類缺乏真的根、莖、葉和其他可在高等植物上發現的組織構造。藻類與細菌和原生動物不同之處，是藻類產生能量的方式為光合自營。藻類涵蓋了原核生物、原生生物界和植物界。原核生物界中的藻類有藍綠藻和一些生活在無機動物中的原核綠藻。屬於原生生物界中的藻類有裸藻門、甲藻門（或稱渦鞭毛藻）、隱藻門、金黃藻門（包括矽藻等浮游藻）、紅藻門、綠藻門和褐藻門。而生殖構造複雜的輪藻門則屬於植物界。屬於大型藻者一般僅有紅藻門、綠藻門和褐藻門等為大型肉

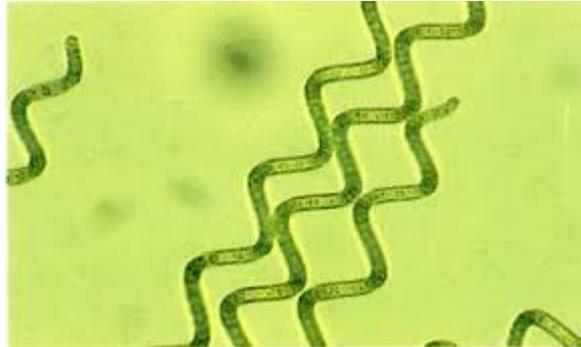
眼可顯而易見之固著性藻類。此類大型藻幾乎 99%以上之種類棲息於海水環境中，故大型藻多以海藻稱之。另外，有些肉眼可見的固著性藍綠藻和少數之矽藻嚴格而言應該亦屬於大型藻的範圍。

藻類其實可視作構造簡單的植物，可行光合作用卻不具根莖葉等構造繁多且分布廣泛，在河川、海洋都能見到藻類的身影，依照生長環境又可分為淡水藻或海水藻，依照大小又可分為巨藻及微藻，微藻必須使用顯微鏡才能清楚觀察，然而藻類卻也供應了世界上超過 80%的氧氣，要是少了這些藻類，大氣中的二氧化碳將提高三倍以上。常說的藻類生質柴油，主要使用的藻種為單細胞微藻，它的構造簡單，因此生長快速，具有高產量的優點，且不同的微藻所含有的營養成分也各有不同，能應用於多方面不同的產業，例如生質燃料、食品、或是萃取高價值化合物。

1. 藻類生長速度快，產量遠高於陸生植物
2. 藻類不需與民爭糧、與糧爭地
3. 也能於產油的同時一併提煉出高經濟價值產品如 DHA、EPA 等脂肪酸

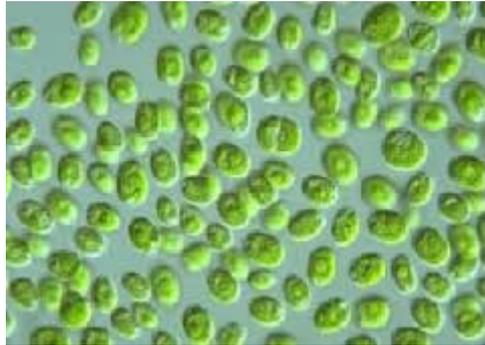
一、微藻藻種

1. 螺旋藻(Spirulina)



螺旋藻是單一個體呈螺旋狀長條，大小約為 0.5 毫米(mm)，可在淡水及海水中生長，可進行自營及異營作用，螺旋藻也是很常見的培養藻種，因為它的生長速度快，大小相對於其他微藻大得多因此容易收集，適應環境能力強，在夏威夷、中國大陸南部、美國加州等熱帶地區皆有養殖廠，螺旋藻大部份成份為蛋白質，但僅有約 10-20% 成份為油脂，因此不適合作為生質柴油原料藻種，高蛋白質適合做為營養品或是飼料，在一般藥局常見的螺旋藻錠，即由這些螺旋藻製成。

2. 小球藻(Chlorella)



小球藻的大小約在 3-10 微米(μm)之間，可以在淡海水甚至土壤中發現他們的蹤跡，與螺旋藻一樣，皆可依照環境進行自營或異營作用，其適當的培養環境為 25~35°C 的熱帶地區，小球藻依生長階段不同，油脂含量變化大，在初期快速生長時，僅有約 20% 的成份為藻油，然而當受到環境壓迫的情況下（例如缺乏營養），油脂成份便開始提高，最高可達約 50% 藻體成份為油脂，因此小球藻是目前最廣為應用於生質柴油的藻種，但是小球藻體型微小，收集難度較高，因此成本也比培養螺旋藻高，除此之外，常聽到的健康食品綠藻片，通常就是以小球藻製成。

3. 柵藻(Scenedesmus)



柵藻的名字由來是因它們時常並排出現的特性，長條形的柵藻會以偶數個體並排，看起來就像柵欄一樣，因此叫柵藻，體型比小球藻大，約 10-25 微米(μm)，柵藻僅能生活於淡水裡，在陸上的湖泊、河流都可以發現它們的蹤跡，培養柵藻的適當溫度比小球藻略低一些，20-30°C 最為合適，它們的油脂含量在 15-40% 之間，因為其適應環境能力強、具備自營與異營的能力，越來越多人開始研究利用柵藻處理廢水來產生生質燃料的技術。

4. 衣藻(Chlamydomonas)



衣藻的特徵是具有兩條長長的鞭毛，是少數可在水中自由活動的藻種。在細胞前端具有眼點(eye spot)，可以感應光源位置而利用鞭毛移動至光源充足的地方，大小約 10-30 微米(μm)，屬於淡水藻，油脂含量大約是 20%，部份種類可在低溫環境生長，衣藻是目前基因定序最完整的藻種，因此常見於基因改良工程，有許多研究改良吸收光源中心(Light Harvesting Complex)，增進衣藻的光合作用效率。

5. 葡萄球藻(Botryococcus)



葡萄球藻是淡水藻，因其形狀以及傾向聚集在一起的特性而得名，大小約為 8-15 微米(μm)，葡萄球藻是目前油脂含量最高的藻種，最高可達 86% 成份皆為油脂，然而葡萄球藻的數量大約每 72 小時才能成長一倍，相較於小球藻約 8 小時成長一倍的速度，葡萄球藻的生長速度可說是非常緩慢，並且經過進一步研究指出，葡萄球藻的油脂並不適於轉脂化製成生質柴油，因此目前越來越少人使用葡萄球藻作為生質燃油之用。

表 2 各種藻類比較差異

藻類	特徵形狀	大小	生長速度	收集速度	油脂含量
螺旋藻	螺旋長條形	05 mm	快速	快	10-20%
小球藻	圓形顆粒狀	3-10 μm	快速	難度高	20%-50%
柵藻	長條形	10-25 μm	普通	易	15-40%
衣藻	兩條鞭毛	10-30 μm	普通	普通	20%
葡萄球藻	聚集狀	8-15 μm	緩慢	普通	86%

2.2 藻類生長方式

1. 呼吸作用

呼吸作用，是生物體細胞把有機物氧化分解並轉化能量的化學過程，也稱為釋放作用；又稱為細胞呼吸（Cellular respiration），無論是否自養，細胞內完成生命活動所需的能量，都是來自呼吸作用，真核細胞中，粒線體是與呼吸作用最有關聯的胞器，呼吸作用的幾個關鍵性步驟都在其中進行。

呼吸作用是一種酶促氧化反應，雖名為氧化反應，不論有否氧氣參與，都可稱作呼吸作用（這是因為在化學上，有電子轉移的反應過程，皆可稱為氧化），有氧氣參與時的呼吸作用，稱之為有氧呼吸；沒氧氣參與的反應，則稱為無氧呼吸。

呼吸作用的目的，是透過釋放食物裡之能量，以製造三磷酸腺苷，即細胞最主要的直接能量供應者，呼吸作用的過程，可以比擬為氫與氧的燃燒，但兩者間最大分別是：呼吸作用透過一連串的反應步驟，一步步使食物中的能量放出，而非像燃燒般的一次性釋放。

2. 光合作用（Photosynthesis）

光合作用（Photosynthesis）是植物、藻類等生產者和某些細菌，利用光能，將二氧化碳、水或是硫化氫轉化為碳水化合物，光合作用可分為產氧光合作用（oxygenic photosynthesis）和不產氧光合作用

(anoxygenic photosynthesis)。

植物之所以被稱為食物鏈的生產者，是因為它們能夠透過光合作用利用無機物生產有機物並且貯存能量，其能量轉換效率約為6%^[1]，通過食用，消費者可以吸收到植物所貯存的能量，效率為10%左右，對大多數生物來說，這個過程是他們賴以生存的關鍵，而地球上的碳氧循環，光合作用是其中最重要的一環。

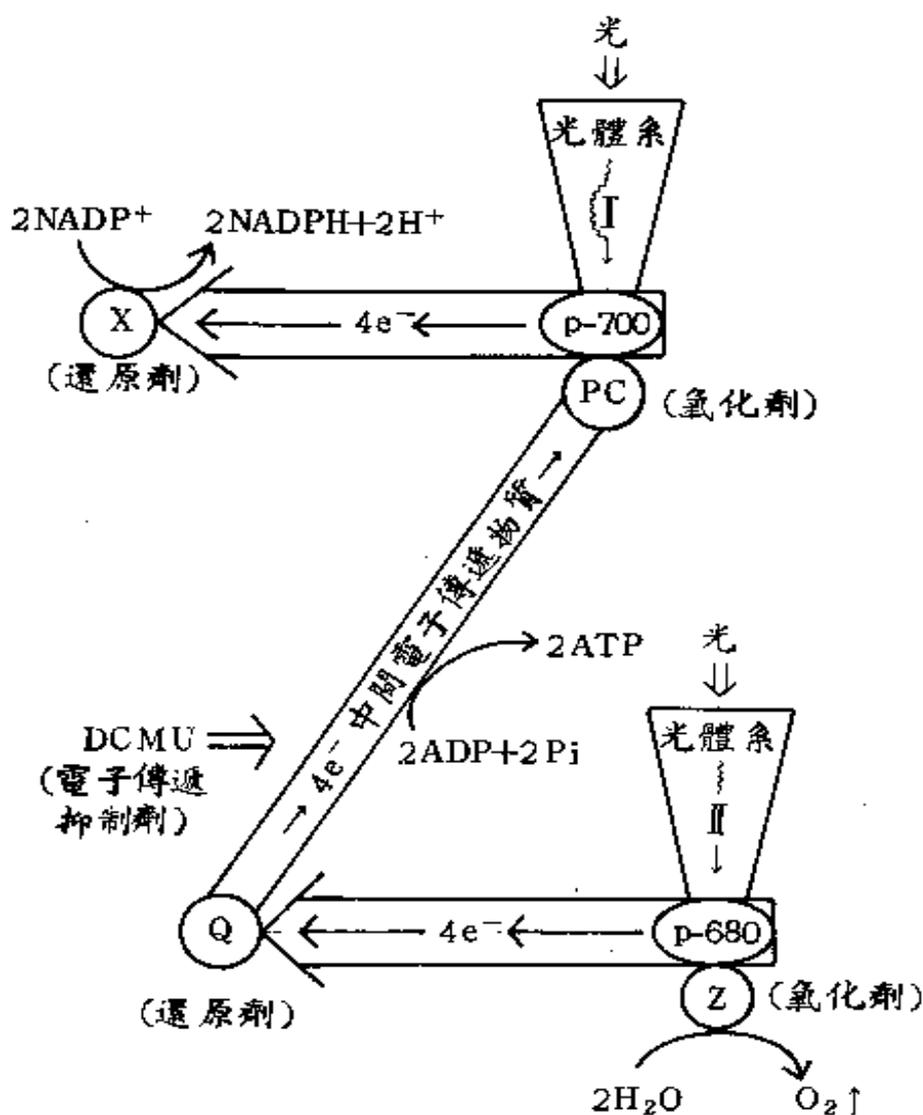


圖 2-1 光合作用之光反應電子傳遞途徑示意圖

2.3 影響生長的調控因子

(1) 水分與滲透壓

微生物的細胞膜是選擇性半透膜，細胞內外滲透壓不同時會導致水分的移入或移出，當細胞置於「高張溶液」時（溶液中溶有較多的溶質，滲透壓比細胞內高，例如鹽水與糖水），水分會從細胞中流出，導致細胞的萎縮，微生物的生長則會受到限制；例如以大量鹽或糖醃漬食品可以防止微生物的繁殖，具有保存食品的功效，而當細胞置於「低張溶液」時（滲透壓低於細胞內，例如蒸餾水），水分又會向細胞內擴散，使細胞膨脹；由於多數藻類、真菌、及細菌具有一堅硬的細胞壁，因此細胞可以大致維持其形狀而不會漲破；但如原生動物的細胞因無細胞壁，則必須具備特殊構造將不斷滲入的水分排出，否則細胞將因不斷膨脹而破裂。

(2) pH 質(酸鹼度)

大多數的微生物偏好在中性的環境下生長，過酸或過鹼都會抑制其生長，但是也有些微生物是所謂的「嗜酸生物」或「嗜鹼生物」，它們可在酸性或鹼性的環境中生長，例如乳酸菌、醋酸菌偏好酸性的環境，造成人類胃潰瘍的幽門螺旋菌則可在胃酸中存活；此外也有一些酸性溫泉中的細菌可耐酸達到 pH1~2 左右，而一些嗜鹼微生物則可生活在 pH10 以上。

(3)溫度

微生物依其對溫度的愛好可分為「嗜低溫生物」、「嗜中溫生物」、及「嗜高溫生物」，我們人類活動的環境中以嗜中溫微生物最多；包括所有的人類共生菌及致病菌，嗜低溫微生物常可在 $0^{\circ}\text{C}\sim 20^{\circ}\text{C}$ 之間生長，例如從南北極或深海中分離出的微生物大多屬於此類生物，而嗜高溫生物則通常生存在溫泉中或海底火山口附近，它們通常需要至少在 45°C 以上的環境才能生長；某些種類甚至可在接近 100°C 的溫泉中生活，目前所知的最高溫度紀錄是生活在海底火山口的一些硫化細菌，它們可耐高達 135°C 的溫度！

(4)氧氣濃度

大多數的藻類、真菌、及原生動物都是好氧性的生物；但細菌的差異性則極大，細菌依其對氧氣的需求可區分為「好氧菌」、「微好氧菌」、「兼性厭氧菌」、與「絕對厭氧菌」，氧氣對好氧性生物而言是呼吸作用中所不可缺少的要素，但對絕對厭氧菌而言則是致命的毒藥，這些絕對厭氧菌必須生活在絕對無氧的環境中，例如沼澤或湖泊的底部污泥中及反芻動物的瘤胃或其他動物的消化道中，微好氧菌則生活在氧氣濃度較低的環境中，但它們又不能完全無氧；例如常生活在人類口腔、消化道、及生殖道中的彎曲桿菌（*Campylobacter*）就是此種生物。

(5) 壓力

多數微生物是生活在壓力約為一大氣壓的地表附近，但是佔地表達四分之三的海洋中也生存著許多生物；當水深每增加十公尺時，其壓力也會增加約一大氣壓；例如太平洋的馬里亞那海溝底部壓力可達1000大氣壓，因此生活在海洋底部，尤其是一些深海生物，通常都能耐受極大的壓力，是「嗜壓力生物」，這些嗜壓力微生物通常也是嗜低溫生物，因為海洋深處的溫度通常很低，終年維持在 $2^{\circ}\text{C}\sim 3^{\circ}\text{C}$ ，這些微生物在海底的營養物質循環上扮演了很重要的角色，它們通常無法在「低壓」的情況下生存。

2.4 藻類培養系統

1. 開放式培養

(1) 圓池培養



利用圓形池子有利均勻混合藻類與水，防止藻類沉澱，也讓藻類可以平均地接受日照，主要是養殖螺旋藻，因螺旋藻生長在鹼性環境裡，較不易受外來生物污染，因此螺旋藻常用於開放式培養。

(2) 跑道式培養



利用水車促使水流在跑道裡流動，其優點為輸入能量少，僅需要水車轉動的電量即可而且跑道式的設計比圓形池能更妥善利用空間，但缺點也是只依靠水車轉動，攪拌沒有圓形池均勻。

2. 密閉式培養

(1) 高密度直立式培養系統



利用塑膠材料製成立體懸掛式的封閉型培養反應器，懸掛直立式可以更加妥善利用空間與光線，塑膠材料也能降低密閉式反應器的成本，且個體式的培養也可減少外來微生物污染，但需要個別曝氣來進

行攪拌也造成較高能量花費，直立式懸掛也須考慮培養袋之間相互蔽屏之問題。

(2)管式光反應器



密閉式反應器之缺點，藻類可能會附著於反應器內側，因此光線會無法穿透進入反應器內部而被有效利用，且在密閉環境裡，光合作用產生的氧氣會累積在反應器中並且抑制藻類生長，但加州 Biocentric 公司研究出可將塑膠球放進管狀反應器中，讓球在管內移動，清理管壁並且將氧氣擠出。

2.5 藻類收集

1. 離心法 Centrifugation



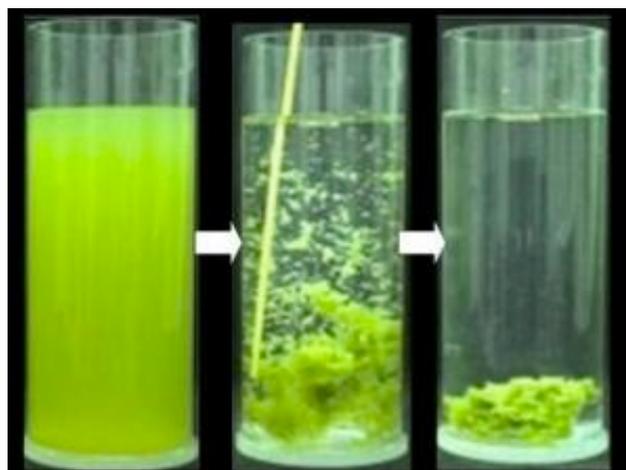
離心法為實驗室中最常見的濃縮方法，是利用高速旋轉產生離心力使水中不同密度的物體分離，進而收集濃縮藻液，但根據不同的旋轉速度，收集到的藻液含固量可由原本 0.1% 濃縮成 5% 至 20% 之間，但離心法必須輸入大量能量以達到高速旋轉，較不適合應用於生產能源為目的製程中。

2. 過濾法 Filtration



過濾法是利用重力或者是加壓之方式，強制讓藻液透過濾膜，而比濾膜孔徑大的微藻將會留在另一邊以便於收集，這是目前藻類工廠最於常見的收集方式，過濾後的藻液含固量可達 20 至 30%，然而過濾法的缺點為濾膜會隨著使用時間變長而逐漸阻塞，必須定期更換或清洗濾膜，而利用加壓之方式，會造成可觀的能量花費，較不常使用。

3. 絮凝法 Flocculation



絮凝法常用於專業水處理廠中，加入化學藥劑使水中懸浮顆粒凝聚在一起進而形成大顆粒而沉降至池底，在藻類收集裡，加入氯化鋁促使微藻聚合沉澱而方便收集，由絮凝法收集到的藻液含固量可達30%，但是購買絮凝藥劑對大規模培養來說卻是相當可觀的花費，因此許多專家研究透過改變二氧化碳濃度或是 pH 值來引發微藻自體絮凝來減少支出，但目前僅發現極少微藻有此種特性，所以還處於研究階段。

4. 懸浮法 Flotation

懸浮法類似絮凝法，也是常用於水處理廠，懸浮法是由池底導入微小氣泡，在氣泡的上升中會一併將微藻帶至水面上，微藻會在液體表面聚集，之後便可在表面收集濃縮後的藻液，懸浮法可以快速處理大量的藻液，但所收集到的藻液濃度較低，含固量不到5%，因此常

會與絮凝法並用，使用絮凝劑可使微藻聚集為較大的團塊，便可輕易的使團塊浮於水中。

5. 其他收集法

還有許多正在發展的收穫技術，例如利用毛細現象設計的雙層濾膜就可以利用極少的能量達到除水的效果，其它還有利用滲透壓除水、或是利用駐波集中微藻再加以收集…等等，這些方法都還在研究試驗中。

2.6 藻油轉換生質能源方式

目前並無最佳轉換法可適用於所有藻類生物，即便都是藻類，因藻種或生長環境不同，生物質的化學成分都會有大幅的改變，一般而言，液態燃料可作為交通運輸燃料因此價值較高，固態燃料與氣態燃料常用於發電，各有優缺點，固態燃料較易運輸；氣態燃料燃燒後較為乾淨，因此選擇轉換方式必須依主要目的選擇是當方法。

目前生物質轉換法可分為熱化學轉換法及化學轉換法，兩者各有優缺點，需依照使用需求來做選擇。

表 3 藻油轉換生質能源之方式比較

轉換方式	方式	反應時間	消耗能量	產品經濟價值
熱化學轉換	加熱	短(1 小時)	較多	較低
化學/生物轉換	化學藥劑	長(數小時)	較少	高

1. 熱化學轉化法又可分為

(1) 汽化 Gasification

是將生物質在高溫 800 至 1000°C 且氧氣充分的環境下分解為類似甲烷的氣體，可直接使用魚蒸汽渦輪發電機產生電力，汽化的最大優點是對生物質的成份要求很低，即便不是高油脂含量也能轉化成甲烷，但在理想的汽化環境中，生物的含水量大約在 5 至 15% 因此汽化前必須進行一道乾燥手續。

(2) 熱裂解 Pyrolysis

將生物質在無氧的環境下加熱至 300 至 700°C，內所含有的有機物會分解為氣態、液態、固態產物，產出的液態產物可經由提煉後得到與汽油相似的產品，而固態產品經過收集處理後可當肥料使用，而熱裂解與汽化相同，在進行前都必須經過乾燥步驟才能有較好之能量產出。

(3)熱水解 Hydrolysis Liquefaction

此種方法溫度較低大約在 250 至 350°C，且需要在 50 到 200 大氣壓下進行反應，主要產物為液態的粗油，其方法優點為可使用的含水量高，可省略乾燥步驟，但因粗油雜質太多，必須經過純化才可用於交通工具上。

2 化學/生物轉化法

(1)轉脂法 Transesterification

轉脂化是目前藻類生質能源最主要發展的方向，目前藻油的萃取主要是利用化學藥劑（己烷）萃取，然而在有水的情況下，己烷的萃取效率很差，因此還是要事先將生物質乾燥後才能進行萃取，如此一來就消耗了大量的能源，目前已有科學家企圖研發能夠在潮濕生物質中萃取油脂的化學藥劑，加速產業化的時間

(2)酒精發酵 Fermentation

讓酵母菌在缺氧的環境中將生物質中的醣類轉化為酒精，再經過蒸餾塔純化酒精，即可得到能直接與汽油混合使用的高純度酒精，酒精發酵的優點就是它能處理含水量很高的生物質(95%)，因此在收穫的之後不需經過太多的處理就能進行發酵，但是後端蒸餾塔的能量消耗相當可觀，這也使得目前並沒有太多人使用藻類生物質進行酒精發酵。

(3)厭氧發酵

厭氧發酵的過程與酒精發酵很相像，在酵母菌將生物質轉化為酒精之後，其他微生物會繼續將酒精進一步分解為甲烷跟二氧化碳，厭氧發酵的優點有很多，例如對生物質的成份要求低，生物質不需含有很多油脂或是澱粉也能轉化出甲烷，還有厭氧發酵也能處理含水量高的生物質，但厭氧發酵最大的缺點為反應時間相當長，一批次約需 15 至 30 天，因此需要的空間也大，使用上比較適合具有較大空地的工廠。

第三章 實驗及分析方法

3.1 儀器設備

儀器	型號	廠商	國家
分光光度計	LR45227	Thermo Milton Roy	法國
低溫培養箱	RI1000	一升科技股份有限公司	台灣
高溫滅菌器	TM-329	東明儀器有限公司	台灣
離心機	2300K	HermleLabortechnik	德國



3.2 藥品

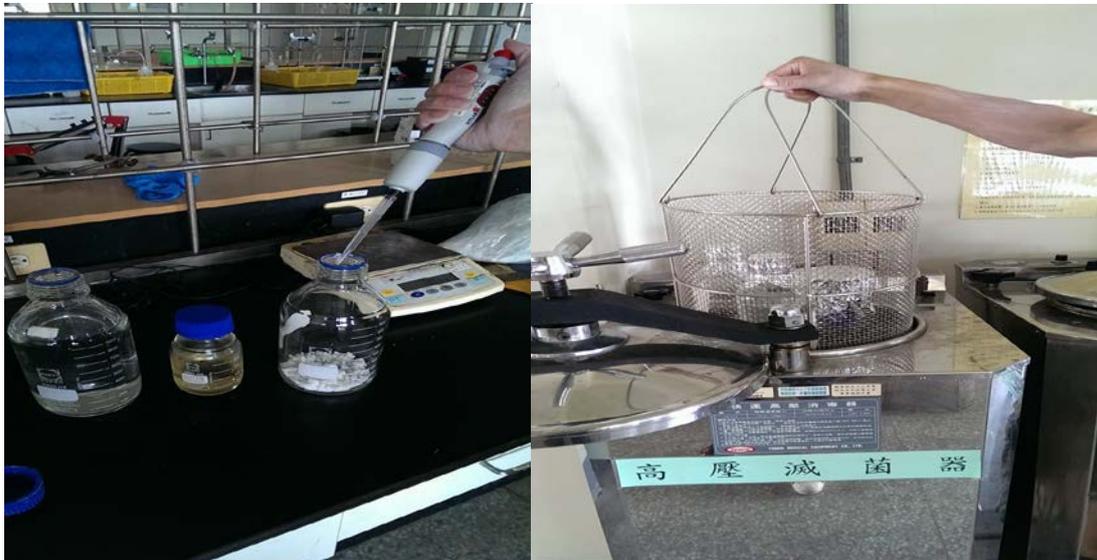
藥品	廠商	批發商	等級
海鹽	Red sea	魚中魚	飼料級
尿素	SHINADA	島田化學研究 所	試藥級
維他命	Merck	景明化工	試藥級
海藻酸鈉	ACROS		試藥級
氯化鈣	島久藥品株式 會社		試藥級

小球藻液:由中興大學化工所劉永銓教授實驗室提供

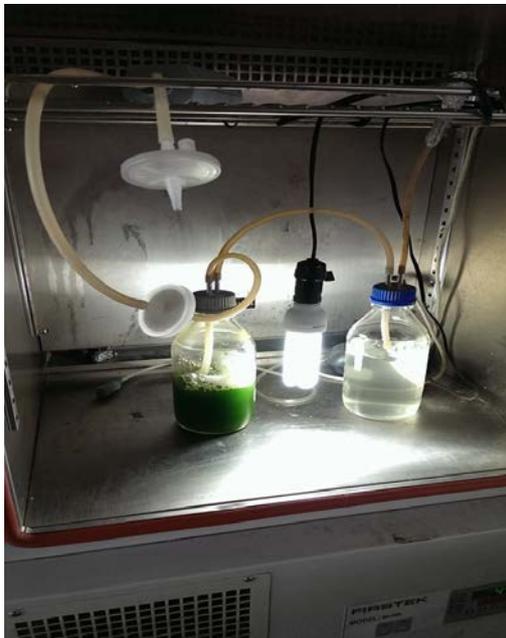


3.3 小球藻培養

1. 取 30g 海鹽放入培養瓶內，再加入 1ml 礦物質、1ml 尿素，接著加入 900ml 水，再取另一瓶子加入 700ml 水，蓋上蓋子，將瓶口蓋子處用鋁箔紙包覆，再將其鬆開，放置高溫滅菌箱滅菌。



2. 滅菌完待降溫後，移至無菌操作台內，再加入 1ml 維他命、100cc 小球藻母液，接著換上通氣蓋子及橡皮管，完成後放入恆溫培養箱培養五天



3. 放入培養箱前，將要培養的綠藻取出微量 使用分光光度計，設定在 682nm 測試 OD 值，記下數據並在往後培養的日子裡，每天都必須取出微量測試並記錄數據取完，再放入培養箱培養。



3.4 小球藻固定化

1. 血清瓶內加 145.5g 水加熱攪拌之後，一點一點慢慢加入 4.5g SA(海藻酸鈉)，以配置 3%SA。



2. 0.882g 0.03M CaCl_2 、200ml 無菌水至血清瓶中攪拌均勻，再把先前配置的 3%SA(海藻酸鈉)，一起放入高壓滅菌器滅菌後，放置冷卻。



3. 取 37ml 小球藻離心 1000rpm*10min 沉澱物加到 3%SA。



4. 吸 1ml 混合藻，以 10 滴/ml 慢慢滴入 0.03M CaCl_2 裡，慢慢形成顆粒狀(beads)，30 分鐘後硬化，存放至 4°C 冰箱內保存。



5. 調整因素, 測試固定化過程之關鍵控制。(分四組)

(1) 原先條件

(2) 調整 3% SA(海藻酸鈉) 改至 4.5% SA(海藻酸鈉)

(3) 改變菌藻 37ml 改至 50ml

(4) 改變 SA(海藻酸鈉) 至 4.5%，改變菌藻至 50ml

3.5 復育步驟

1. 量 30g 小綠藻放置血清瓶，再加入 6ml, 5%SH 以及 24ml 培養液。



2. 放置加熱器上均勻攪拌(不用加熱)24h 後，再加入 220ml 培養液。



3. 放入培養箱內培養，依上述 3.2 培養方式，將要培養的綠藻取出微量 使用分光光度計，設定在 682nm 測試 OD 值，記下數據並在往後培養的日子裡，每天都必須取出微量測試並記錄數據取完，再放入培養箱培養。。



第四章 結果與討論

4.1 小球藻的存放效果

依步驟3.1方式, 將存放在4°C之小球藻液, 一定時間取出作培養, 觀察小球藻生長曲線變化, 實驗結果如圖 4-1。由圖 4-1 發現, 小球藻經長期的保存, 生長趨勢曲線會慢慢降低; 小球藻在第 7 天~第 41 天, 成長非常活躍($OD_{684} \doteq 1.85$), 但到第 63 天~第 126 天 OD 值就開始下降, 由 1.406 降至 1.188, 表示小球藻慢慢的衰敗。

由實驗數據可知, 在 4°C 下長時間保存, 小球藻會因養分耗盡、長期增殖而衰敗, 無法持續保存。

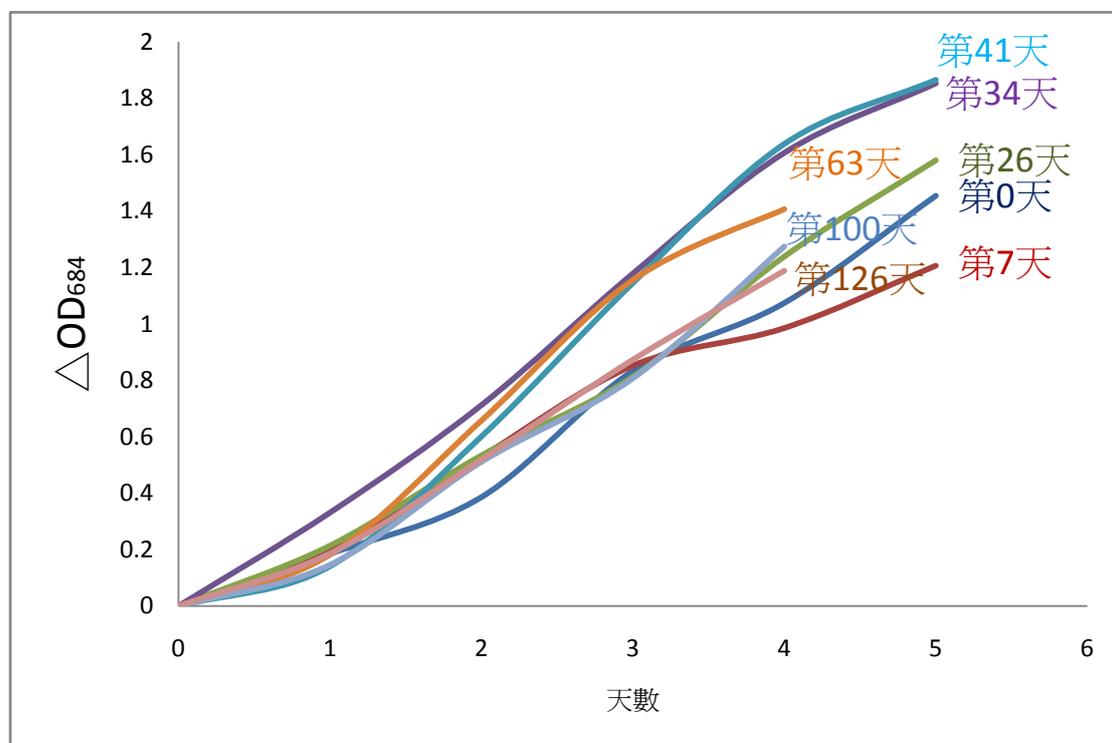


圖 4-1 小球藻的存放效果

表 4-1 小球藻保存在 4°C、4 個月的存放效果

培養天數	第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
OD ₆₈₂ 第 0 天	0.149	0.334	0.535	0.982	1.223	1.603
△OD=OD _i -OD ₀	0	0.185	0.386	0.833	1.074	1.454
OD ₆₈₂ 第 7 天	0.143	0.339	0.672	0.995	1.128	1.349
△OD=OD _i -OD ₀	0	0.196	0.529	0.852	0.985	1.206
OD ₆₈₂ 第 26 天	0.114	0.328	0.648	0.927	1.353	1.694
△OD=OD _i -OD ₀	0	0.214	0.534	0.813	1.239	1.580
OD ₆₈₂ 第 34 天	0.163	0.494	0.875	1.341	1.769	2.015
△OD=OD _i -OD ₀	0	0.331	0.712	1.178	1.606	1.852
OD ₆₈₂ 第 41 天	0.139	0.280	0.740	1.284	1.777	2.004
△OD=OD _i -OD ₀	0	0.141	0.601	1.145	1.638	1.865
OD ₆₈₃ 第 63 天	0.135	0.317	0.792	1.29	1.541	
△OD=OD _i -OD ₁	0	0.182	0.657	1.155	1.406	
△OD ₆₈₄ 第 100 天	0.188	0.334	0.699	0.995	1.462	
△OD=OD _i -OD ₂	0	0.146	0.511	0.807	1.274	
OD ₆₈₅ 第 126 天	0.195	0.381	0.714	1.068	1.383	
△OD=OD _i -OD ₃	0	0.186	0.519	0.873	1.188	

4.2 固定化小球藻之長期保存效果

依上述實驗結果, 為達到長期保存效果, 首先依 3.4 實驗步驟, 進行小球藻固定化試驗。再將固定化小球藻定期拿出, 依 3.6 實驗步驟進行復育培養, 測試保存效果, 結果如圖 4-2。由圖 4-2 可知第一個月與第三個月之培養 5 天後, OD 值相差不多(約 0.26)。由此結果可知固定化小球藻具有長期保存效果。

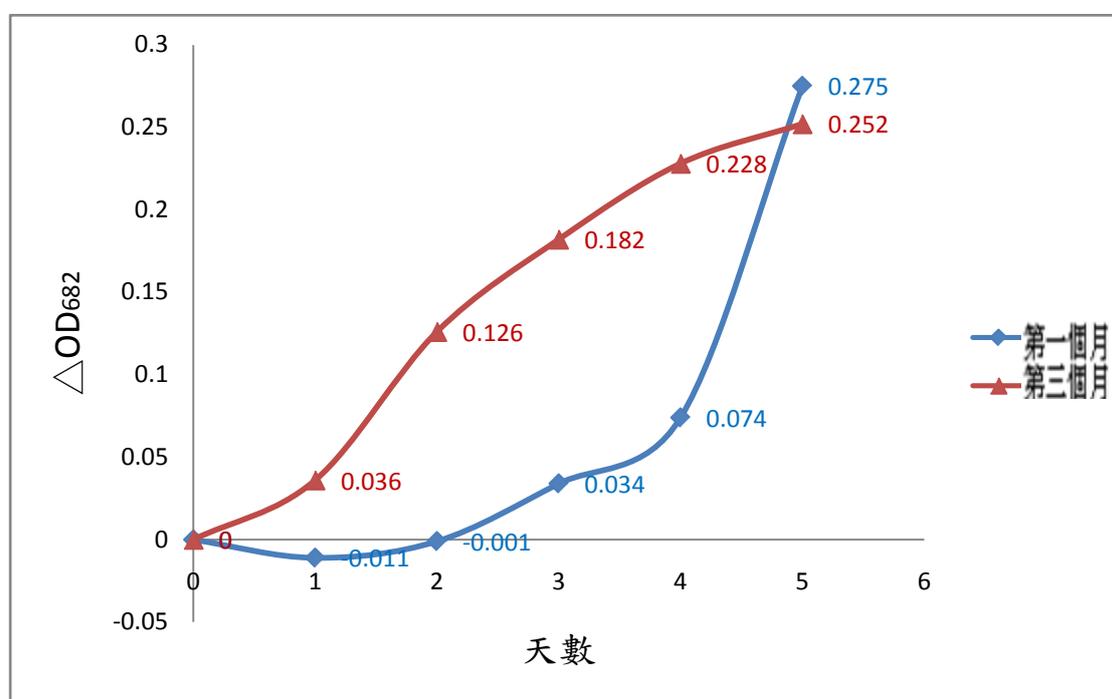


圖 4-2 固定化小球藻之長期保存效果

表 4-2 固定化小球藻之長期保存效果

培養天數 保存時間	第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
ΔOD_{682} (第一個月)	0	-0.011	-0.001	0.034	0.074	0.275
ΔOD_{682} (第三個月)	0	0.036	0.126	0.182	0.228	0.252

4.3 探討固定化影響因素

由上述實驗結果知，小球藻固定化具有長期保存效果，相同固定化實驗步驟條件下，接續探討固定化每個原料影響效果，因此本實驗改變 3 個條件進行培養(其他成份不變)，測試影響效果：

- (1)調整 SA 由 3%至 4.5% (比原先增加 1.5 倍)。
- (2)改變藻菌量由 37m 至 50ml (比原先增加 1.5 倍)。
- (3)改變藻菌量由 37m 至 50ml、調整 SA 由 3%至 4.5%。

4.3.1 海藻酸鈉(SA)之影響

調整海藻酸鈉(SA)由 3%至 4.5%(比原先增加 1.5 倍)，因 SA 具吸濕功用，讓小球藻菌內水份不易蒸發。探討小球藻在海藻酸鈉(SA)的包裹下，延長長期保存效果。結果如圖 4-3。由圖 4-3 可知第一個月與第三個月之培養 5 天後，OD 值由 0.05 增加至 0.289。由此結果可知調整海藻酸鈉(SA)量，可提高固定化小球藻長期保存效果。

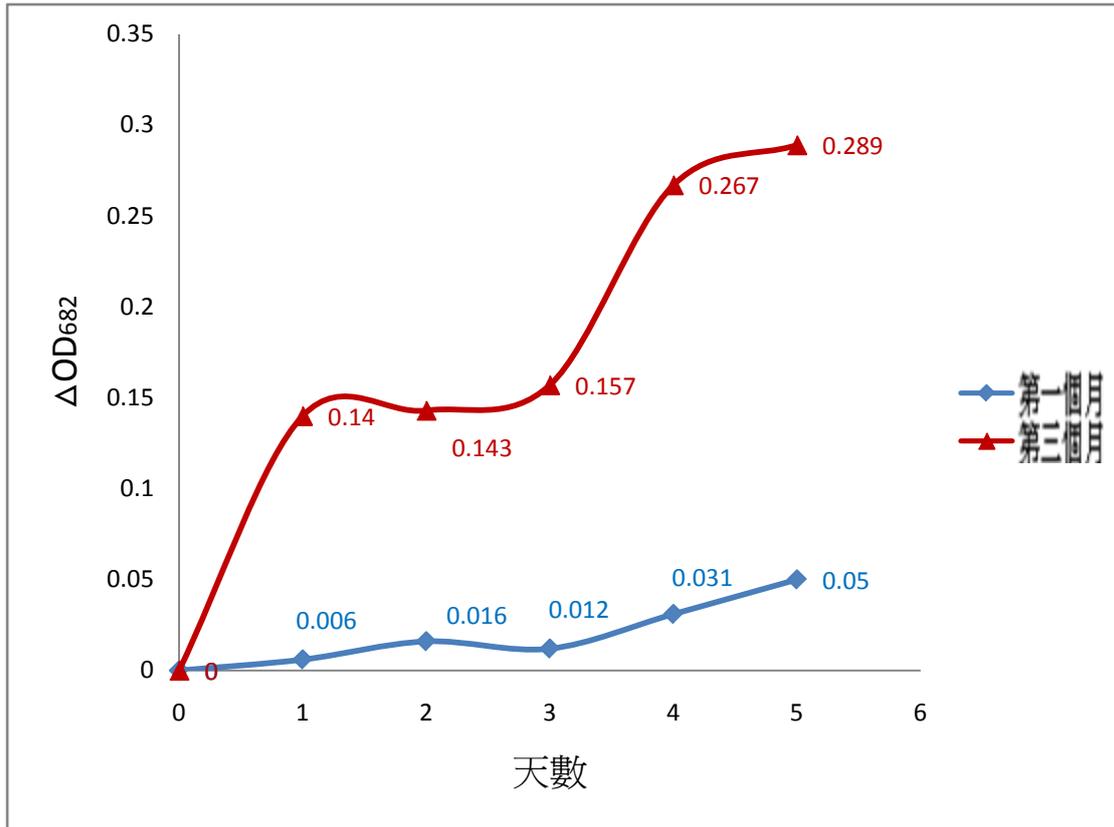


圖 4-4 海藻酸鈉(SA)之影響

表 4-4 海藻酸鈉(SA)之保存時間影響

培養天數 \ 保存時間	第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
ΔOD_{682} (第一個月)	0	0.006	0.016	0.012	0.031	0.05
ΔOD_{682} (第三個月)	0	0.14	0.143	0.157	0.267	0.289

4.3.2 改變藻菌量之影響

改變藻菌量由 37ml 至 50ml (比原先增加 1.5 倍)。調整海藻酸鈉 (SA) 內小球藻量，因 SA 具吸濕功用，小球藻量增多但藻內水份未流失。探討在海藻酸鈉(SA)的包裹下，小球藻量增多對延長長期保存效果。結果如圖 4-4。由圖 4-4 可知第一個月與第三個月之培養 5 天後，OD 值由 0.444 降至 0.147。由此結果可知調整小球藻量，會降低固定化小球藻長期保存效果。

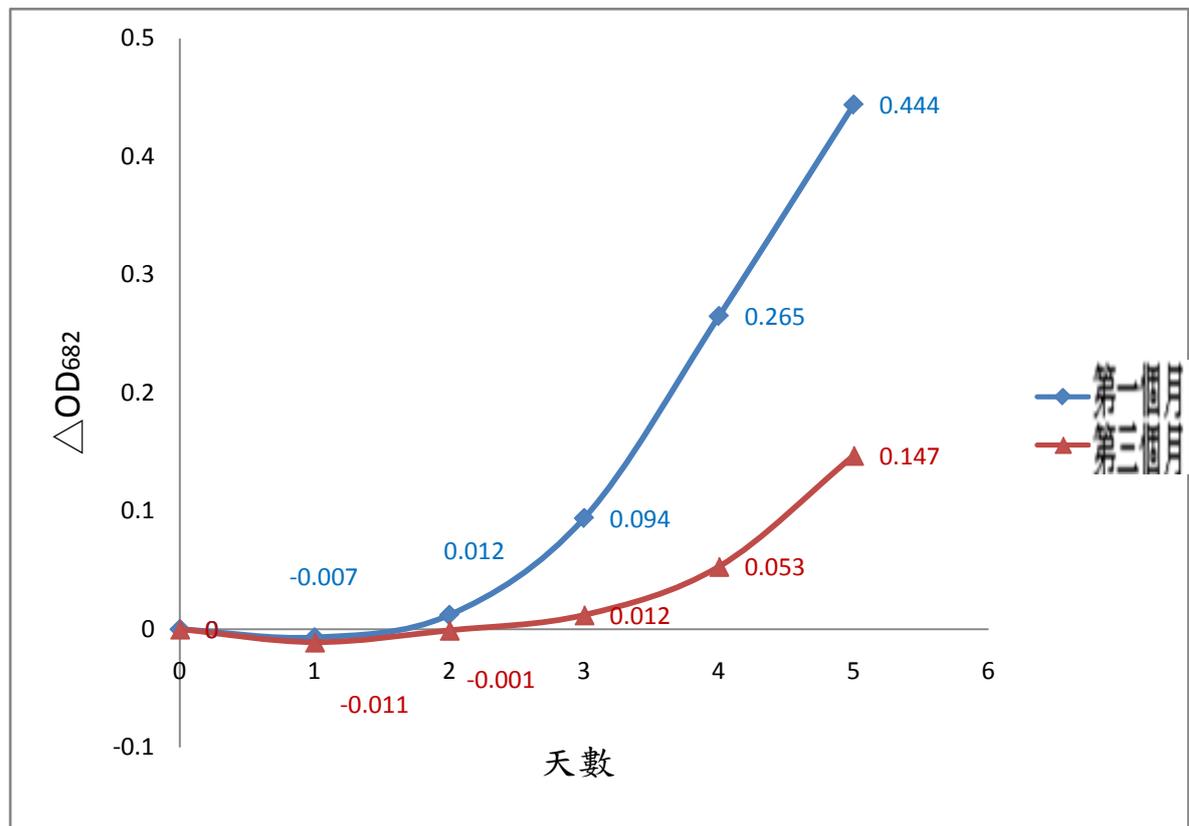


圖 4-5 小球藻量之影響

表 4-5 小球藻量之保存時間影響

培養天數 保存時間	第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
ΔOD_{682} (第一個月)	0	-0.007	0.012	0.094	0.265	0.444
ΔOD_{682} (第三個月)	0	-0.011	-0.001	0.012	0.053	0.147

4.3.3 藻菌量、海藻酸鈉(SA)同步改變之影響

調整海藻酸鈉(SA) 由 3% 至 4.5% (比原先增加 1.5 倍)，改變小球藻量由 37m 至 50ml (比原先增加 1.5 倍)，當兩者同步調整增加時，因 SA 量增多吸濕功用，讓小球藻菌內水份不易蒸發。探討小球藻在海藻酸鈉(SA)的包裹下，兩者對長期保存效果，結果如圖 4-6。由圖 4-6 可知第一個月與第三個月之培養 5 天後，OD 值由 0.112 增加至 1.215。由此結果可知增加海藻酸鈉(SA)量與小球藻量，可提高固定化小球藻長期保存效果。

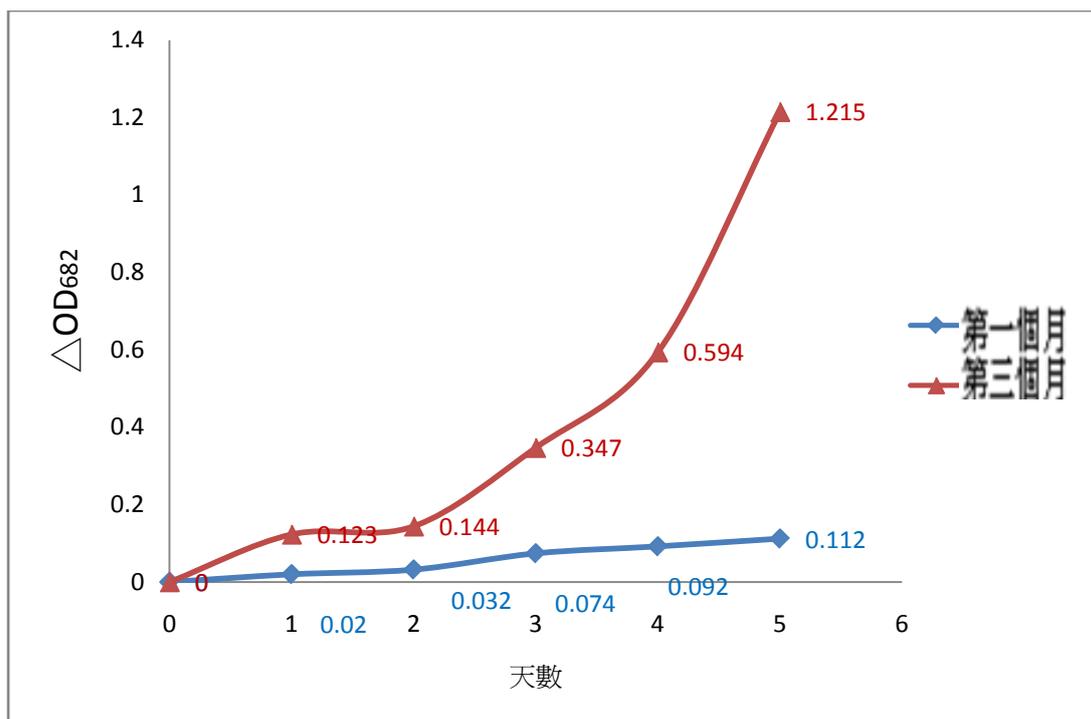


圖 4-6 海藻酸鈉(SA)量與小球藻量之效果

表 4-6 增加藻菌量與海藻酸鈉(SA) 之保存時間影響

培養天數 保存時間	第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
ΔOD_{682} (第一個月)	0	0.02	0.032	0.074	0.092	0.112
ΔOD_{682} (第三個月)	0	0.123	0.144	0.347	0.594	1.215

4.4 小球藻固定化影響因素之綜合比較

由調整海藻酸鈉(SA)由3%至4.5% (比原先增加1.5倍), 改變小球藻量由37m至50ml (比原先增加1.5倍)。探討小球藻在兩者因素下, 對長期保存效果, 結果如圖4-4、圖4-5、圖4-6。綜合比較第三個月之培養5天後OD值, 結果如圖4-7。由圖4-7結果可知, 增加海藻酸鈉(SA)量與小球藻量, 可提高固定化小球藻長期保存效果。因增多SA量提高吸濕功用, 雖小球藻量增加, 但小球藻內水份不易蒸發, 因此小球藻在海藻酸鈉(SA)的包裹下, 提高長期保存效果。

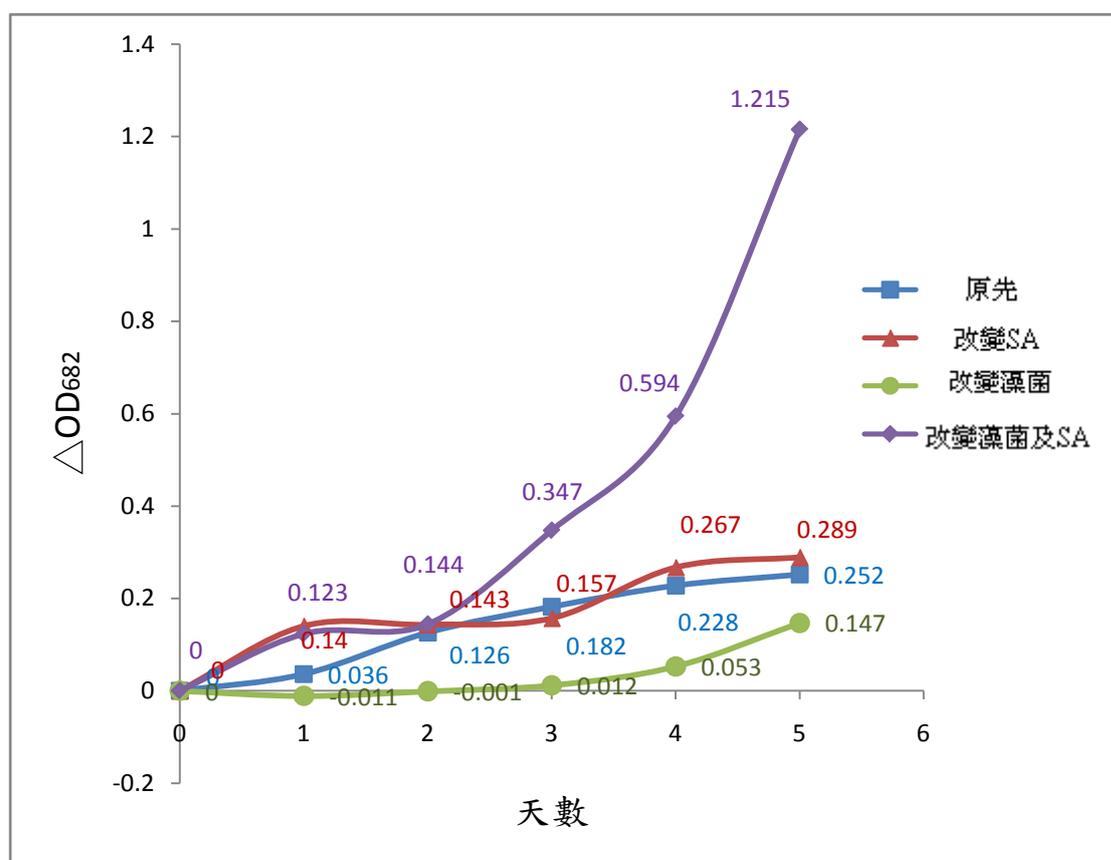


圖 4-4 小球藻固定化影響因素之綜合比較

結論

1. 小球藻液存放於 4°C 下，約 2 個月後，其培養增殖能力會逐漸下降，因此小球藻必須找尋延長保存壽命的方法。經實驗結果，發現，小球藻固定化方法可有效延長保存小球藻液壽命。
2. 小球藻固定化方法，當改變小球藻量從 37ml 變成 50ml 時，發現有的小球藻會破裂，且三個月後培養增殖能力會逐漸下降。另外，當提高海藻酸鈉(SA)量後，小球藻包裹在 SA 內，且不易破裂，且三個月後培養增殖能力會增加，因此提高海藻酸鈉(SA)量，有效延長保存小球藻液壽命。
3. 當提高海藻酸鈉(SA)量與小球藻量後，三個月後培養增殖能力會增加，更有效延長保存小球藻液壽命。由實驗數據很明顯發現，提高海藻酸鈉(SA)量，是小球藻固定化方法重要步驟。

第六章 參考文獻

- 1.郭致廷，生質能源趨勢，(2011)。
- 2.賴玉珊、朱鈞耀、魏道駿、林良平，小球藻萃取液之抗菌活性臺灣農業化學與食品科學 Vol. 42，(2004)。
- 3.邱耀興，小球藻固碳培養條件，長庚大學化工與材料工程研究所碩士論文(2003)。
- 4.陳佑誠、林良平、朱淑尹，固定化微藻之藻體結構中國農業化學會誌民，(1999)。
- 5.徐明光，台灣的淡水浮藻(I)-通論及綠藻(1)，(1999)。
- 6.江晃榮，生物技術與污染防治(一)固定化微生物在廢水處理上之應用，(1990)。
- 7.張伊作，綠藻培養法與飼料，(1965)。