

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 養殖廢水做為生質柴油煉製油脂藻類培養基質之研究
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 廖佩珊
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-041-007-E
研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月
指導教授： 錢紀銘

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學環境資源管理系(含碩士班)

中華民國

103年04月01日

行政院國家科學委員會補助 大專生參與研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 102 —2815—C—041—007—E

執行期限：102 年 7 月 1 日至 103 年 2 月 28 日

嘉南藥理大學環境資源管理系

摘 要

本專題研究主要是探討用漁塭養殖廢水來培養油脂藻類，這個計畫不僅可取代養殖廢水的處理設施，使得魚塭養殖水可以循環使用，達成節省水資源的目的。本專題對魚塭養殖廢水水質的監測結果中氨氮的平均值約 2.10mg/L；亞硝酸鹽的平均值約 12.03mg/L；硝酸鹽氮的平均值約 2.82mg/L，顯示水中的主要的汙染物是含氮的營養鹽類。而本專題所選用的小球藻 (*Chlorella vulgaris*)及柵藻(*Scenedesmus dimorphus*)在此環境並沒有完成馴養產生油脂。但是，分析漁塭水中的原生藻類的總脂質含量百分比的平均值高達 38.0%，最高值可達 51.2%，頗值得深入探討開發。

關鍵字：油脂藻、生質柴油、替代能源

Abstract

In this study, the aquaculture wastewater us used a substrate to cultivate oil-producing algae and it will offer an alternative way to treat aquaculture wastewater and water recovery. From the results of monitoring program, the average concentrations of ammonia-nitrogen, nitrite-nitrogen, and nitrate-nitrogen are 2.10mg/L, 12.03mg/L, and 2.82mg/L, respectively. It shows that nitrogen contained nutrients are the main pollutants of aquaculture wastewater. However, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* cannot survive in this wastewater. From the oil content analysis of the aquaculture wastewater, the oil content averages as 38.0% and the highest is 51.2%. It shows a high potential to investigate this issue.

Keywords: oil-producing algae, bio-diesel, alternative energy

一、前言

全球化石能源日益短缺，高漲的能源價格已經令人無法負擔，所以，

全球各國除了倡導各項節能措施，而積極開發或尋找各種替代能源，便成為現今世界各國最重要議題之一(台灣綜合研究院，2007)。在各種替代能源中，生質能源的開發與利用近年來受到高度的重視，在我國的國家能源政策白皮書中有關「再生能源的生質能應用」政策中就明確說明生質能源發展的重要性。而生質能就是利用農林植物、沼氣、廢棄物等經由直接利用或處理而產生的能源。一般來說，可以利用的生質能包括生質柴油、生質酒精、生質氫能、生質甲烷等(工研院產業經濟與趨勢研究中心，2007)。其中，生質柴油是把動、植物性油脂、廢食用油、廢油炸油等原料，經由轉酯化反應、中和、水洗、蒸餾等過程，生成甲基酯類(生質柴油)的化合物，在此過程中，降低生產成本是一個非常重要的考量因素。

二、文獻回顧與探討

Ratledge(1993)指出某些細菌、真菌或微藻(microalage)等微生物的細胞內能蓄積油脂質超過 20 % (w/w)，這些微生物被稱為油脂性微生物。其中藻類與油脂作物很類似，都可以利用營養物質、太陽能及二氧化碳(CO₂)進行光合作用產生可以生產生質能的物質。前述三者中，太陽與 CO₂ 在亞熱帶的台灣都無須擔心，而營養物質則是需要另外加入到培養系統的物質，這是培養階段主要的成本來源。學生在過去因為參與指導老師與養殖業者進行的產學合作計畫，常到學校附近大湖地區的魚塭進行水質採樣發現水中還有大量的營養鹽，為了去除這些污染物，養殖業者常需要加入各種藥劑或用污染處理設施來去除，但是這些行為常會造成藥物污染、降低水產品品質、增加生產成本。

由於在專題研究過程中發現監測養殖水質時發現豐富的營養鹽，可以有再一步利用的可能。在再利用領域中，用生物吸收環境中的營養物質與大氣中的 CO₂，藉由太陽能進行光合作用而成長，生物體經由各種轉化程序變成生質能，在後續的能源轉化利用後又排出 CO₂，形成碳循環，所以，生質能屬於再生能源的一種而後續利用所造成 CO₂ 之排放量可視為零(Hall, 1997)。

事實上，因為藻類生長速度快，有的 7 個小時內體積就可以加倍，它的生長條件也很簡單，無論是在海水或在陸地池塘裡中，它幾乎可以在任何條件的水域中生存，所以藻類好比是水中之鑽石，具有很高之營養價值與經濟價值，於商業應用上可作為魚蝦貝類之餌料、人類營養保健食品、化妝品、植物性染劑等(Spoladore et al., 2006)。藻類細胞的主要成分大致包括碳水化合物、蛋白質及脂肪三種成分(Sheehan et al., 1998)，藻類依分類不同貯存物質也不一樣，例如褐藻細胞之貯存物質以碳水化合物為主，紅藻及綠藻為葡萄糖聚合物，甲藻多為澱粉，而矽藻常以脂肪為貯存物質(Tortora et al., 2005)。

表 1 是吳佩芬(2006)由以往油脂藻類相關文獻中彙整油脂含量在 15 % 以上之 33 種藻類，表中包括藻種、生態特性、油脂含量與分類，在所收集的資料中可以發現藻類細胞油脂含量分佈大概是 14 ~ 72 %，其中 21 種是淡水藻種，而油脂含量達 70% 有 *Botryococcus braunii*、*Chlorella pyrenoidosa* 與 *Monalanthus salina*。其中 *Botryococcus braunii* 曾在花蓮鯉魚潭、曾文水庫、烏山頭水庫、永和山水庫、蘭潭水庫、石門水庫、翡翠水庫的環境監測結果中出現。經由實驗結果發現台灣水域中普遍存在之綠藻 *Botryococcus braunii* 及矽藻 *Nitzschia palea*，其油脂量在 40 % 以上，極具潛力成為生產生質柴油之料源(吳佩芬，2006；王月姿 2009)。

由於光照、溫度、營養源、CO₂ 與 pH 等環境因素都會影響藻類的生長，所以，對相關文獻的收集是非常重要的。我們都知道藻類需要吸收太陽光進行光合作用獲取能量，因此光照為影響藻類生長之重要因子。例如 *Botryococcus braunii* 可接受之光照強度範圍為 15-180Watt/m² (Cepak and Lukavsky, 1994)，如果要增加生長速度，也可以連續 24 小時日照，但是也會增加養殖成本。至於溫度也會影響藻類的生長，例如 *Botryococcus braunii* 適合生長的溫度是 25°C，當溫度超過 35°C 時，藻細胞的生長速率會較 30°C 降低 17%，若溫度高達 38°C 藻細胞則無法存活(Converti et al., 2009)。

表1 油脂藻類特性彙整表(吳佩芬，2006)

藻種	生態習性	油脂含量(% w/w)	分類
<i>Botryococcus braunii</i>	淡水	53-70	綠藻綱、小球藻科
<i>Chlorella</i> spp.	淡水	15-26	綠藻綱、小球藻科
<i>Chlorella emersonii</i>	淡水	29-63(-N) 25-34(-N)*	綠藻綱、小球藻科
<i>Chlorella minutissima</i>	淡水	23	綠藻綱、小球藻科
<i>Chlorella protothecoides</i>	淡水	18-58	綠藻綱、小球藻科
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	淡水	36,72	綠藻綱、小球藻科
<i>Chlorella sorokiniana</i>	淡水	20-22(-N)	綠藻綱、小球藻科
<i>Chlorella vulgaris</i>	淡水	40-58(-N)*	綠藻綱、小球藻科
<i>Dunaliella bardawil</i> (= <i>D. salina</i>)	海水	47	綠藻綱、杜氏藻科
<i>Dunaliella primolecta</i>	海水	54	綠藻綱、杜氏藻科
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	海水	20.5	綠藻綱、杜氏藻科
<i>Nannochloropsis</i> sp.	海水	20-48	綠藻綱、擬球藻
<i>Neochloris oleabundans</i>	海水	35-54	綠藻綱
<i>Radiosphaera negevensis</i>	沙漠土壤	43	綠藻綱
<i>Scenedesmus</i> spp.	淡水	26	綠藻綱、柵藻科
<i>Scenedesmus acutus</i>	淡水	26	綠藻綱、柵藻科
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	淡水	16-40	綠藻綱、柵藻科
<i>Scenedesmus obliquus</i>	淡水	49	綠藻綱、柵藻科
<i>Scotiella</i> sp.	淡水	16-35	綠藻綱、螺翼藻屬
<i>Oocystis polymorpha</i>	淡水	35	綠藻綱、卵囊藻科
<i>Ourococcus</i> sp.	淡水	50	綠藻綱
<i>Protosiphon botryoides</i>	淡水	37	綠藻綱
<i>Biddulphia aurita</i>	海水	40	矽藻綱、盒形藻科
<i>Navicula pelliculosa</i>	淡水	22-45	矽藻綱、舟形藻科
<i>Nitzschia palea</i>	淡水	40	矽藻綱、菱形藻科
<i>Chroomonas salina</i>	海水	25	隱藻門
<i>Monalanthus salina</i>	海水	70	金藻綱
<i>Ochromonas danica</i>	淡水	39-71	金藻綱、棕鞭藻科
<i>Porphyridium cruentum</i>	海水	14-22	紅藻綱、紫球藻科
<i>Chrysochromulina</i> spp.	海水	33-48	定鞭藻綱
<i>Prymnesium parvum</i>	海水	22-38	定鞭藻綱
<i>Euglena gracilis</i>	淡水	14-20	裸藻門、裸藻科
<i>Peridinium cinctum</i>	淡水	36	渦鞭毛藻綱、多甲藻科

備註：(-N)：低氮源培養基 *：管型光生物反應器

資料來源：Ratledge, 1989；Kosaric & Velikonja, 1995；Illman et al., 2000；Scragg et al., 2002。

藻類生長方式可分為光合自營(Photoautotroph)、混營(Mixotroph)及異營性(Heterotroph)。光合自營的藻類以光做為能量，並利用大氣中的 CO₂ 做為碳源合成碳水化合物，如柵藻(*Scenedesmus acutus*)培養於不含有機碳源的培養基中生長速率較培養於含有機碳源的培養基中快(Ogawa and Aiba, 1981)。另外，氮、磷等營養源也是影響藻類生長之重要因子，氮源通常為硝酸鹽類。當培養系統中之氮源足夠時，可以增加藻細胞之產量，但是在缺氮的環境下，卻有助於藻細胞內油脂之累積(Converti et al., 2009)。而在海水微藻中，由於在高濃度 NaCl 脅迫適應，有助於積累的脂肪含量 (Takagi 等人，2006)。

由先前對學校附近魚塭養殖廢水的水質平均監測結果分別是；溶氧(dissolved oxygen, DO)=3.74 mg/L、溶氧(dissolved oxygen, DO)=3.74 mg/L、pH 值=7.88、溫度=23.36 °C、亞硝酸鹽氮=8.7 mg/L、硝酸鹽氮=3.55 mg/L、氨氮=0.35 mg/L、總磷=0.27 mg/L、生化需氧量(biochemical oxygen demand, BOD)=3.50 /L，由這些水質參數可以發現養殖廢水含有豐富的營養鹽及有機碳源可做為油脂藻類培養之用，這樣做不僅可以節省養殖業者水質處理費用與節約水資源外，同時也可以將所生產油脂藻類作為生質柴油煉製的原料，增加養殖業者的收益。

三、實驗進行步驟與分析

本專題研究主要利用養殖廢水培養油脂藻類，探討其生長特性與油質產出量，期望能大量培養作為生質柴油之料源，以下將對實驗的各項細節進行簡要的說明。

1 油脂藻類培養系統規劃與操作

經由前述對相關脂藻之探討，本專題採用本土相關研究調查曾出現小球藻(*Chlorella vulgaris*)及柵藻(*Scenedesmus dimorphus*)作為主要實驗標的藻種。實驗的培養設備採用錐形瓶作為培養，培養用的錐形瓶體積約為 250 ml。由於台灣南部夏日水溫較高可能會影響藻類生長，會注入空氣以避免水溫過高，同時也可以增加水中 CO₂，提供藻類生長所需要的碳源。實驗考慮油脂藻的生長速度，以注入 CO₂ 提高油脂藻的生長。另外，為了讓錐

形瓶內的培養基水質較為均勻，我們以不定時搖晃的方式讓水質均勻。

培養基的配置方法，依配方將所有藥品加入後，調整 pH 值至 6.8，分裝到錐形瓶(250ml 瓶可置入 100ml 培養基)在進行高溫高壓滅菌。以 45 天更換一次培養基，如有需要也可提早時間進行更換。當藻類還健康的時候(綠色)進行更換，若培養基中營養鹽濃度不高，則須提早更換培養基。一般以觀察藻色來判斷是否更換培養基，藻色偏黃表示微藻開始由穩定期邁向死亡期。此狀態下即使更換培養基也不容易救活，所以需要留意藻色的變化。更換培養基通常是在無菌操作台以經過滅菌的吸管由原來的藻類移入新的培養基中(10-20%)，或是利用微生物操作方式進行(以 75%酒精擦拭桌面再點上酒精燈進行操作)。本專題藻類之培養基以表 1 所示。

表 1 Proteose medium 成分 (UTEX)

成分	含量(g/L)
Proteose peptone	1
NaNO ₃	0.25
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.025
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075
K ₂ HPO ₄	0.075
KH ₂ PO ₄	0.175
NaCl	0.025

pH =6.8

2 水質之採樣與分析

藻類培養系統完成佈置後，即開始各試程的各項採樣、監測及分析工作，每個試程 8~10 天，採樣頻率為每日一次，採樣時間約在當天之上午 8 點~上午 10 點，水質實驗分析包括現場監測與實驗室分析兩類，專題研究所有分析皆依照行政院環境保護署所公告之檢測方法進行。

- (1) 現場監測：每次採樣同時進行現場監測水溫(T)、pH值、溶氧(DO)、氧化還原電位 (ORP) 及導電度 (Electrical conductivity)。
- (2) 實驗室分析：每次以500mL PVC瓶在相同監測位置採集水樣，並且在實驗室中進行各項水質分析，其分析項目包含有生化需氧量(BOD)、

葉綠素-a、總磷(TP)、氨氮(NH₄⁺-N)、硝酸鹽(NO₃⁻-N)、亞硝酸鹽(NO₂⁻-N)等，檢測方法如表2所示。

表 2 綠藻培養管之水質檢測方法彙整

檢測項目	檢測方法
葉綠素-a	NIEA E507.02B
氨氮	NIEA W448.51B
總氮	NIEA W423.52C
硝酸鹽	NIEA W419.51A
亞硝酸鹽	NIEA W418.51C
溶氧	NIEA W455.52C
總磷	NIEA W444.51C
導電度	NIEA W203.51B
水溫	NIEA W217.51A

3 漁塭藻類脂質之分析

藻細胞油脂之萃取過程較為複雜，本專題係採用劉清標(2000)所建議脂方法，如圖 1 所示，乾藻體從養殖漁塭水離心，經冷凍乾燥機凍乾而得。養殖魚塭水樣之水量以 100ml 為一個單位，水樣經過濾後的濾紙進行冷凍乾燥，獲得脂質分析之乾藻體。精稱約 0.1-0.5 g 經冷凍乾燥後之乾藻體，加入 5ml 的氯仿及甲醇以 2:1(v/v)溶劑以超音波振盪 1 小時之方式使乾藻體均勻分散於溶劑中。將振盪後之萃取液以 10000 rpm 之轉速離心，分離萃取液中之氯仿層，取出氯仿層置於已精稱重量之 20 mL 樣本瓶中。以氯仿及甲醇溶劑重覆萃取藻體之步驟，直至氯仿層中無脂質存在。將 20 mL 樣本瓶中含有脂質之氯仿層，以空氣吹乾(一般放在抽氣櫃中 overnight)。經空氣吹乾氯仿的樣本瓶置於 105°C 之烘箱中 1 小時，乾燥水份。最後，精稱 20 mL 樣本瓶之重量。總脂質含量百分比計算方式如下：

$$\text{總脂質含量百分比} = \frac{\text{總脂質重}}{\text{乾燥藻體重}} \times 100\%$$



圖 1 油脂藻類脂之分析流程圖

四、結果與討論

本專題研究主要是利用魚塢養殖廢水進行脂藻養殖可行性之探討，由於魚塢養殖廢水的水質對於藻類的繁殖是非常重要的，本專題對學校附近的合作養殖魚塢進行了水質監測的工作，表 3 中的數據就是魚塢水質的監測結果，由於魚塢的飼養是採用批次式的養殖方式進行，監測期間剛好是夏秋兩季，而南部的水溫也比較偏高，平均溫度約有 31.1°C，而有機汙染監測值(BOD)的範圍約介於 1.25 mg/L~4.36 mg/L，顯示魚塢養殖廢水的有機汙染濃度並不高，總磷的 0.09 mg/L~0.43 mg/L 也表示總磷並不是主要汙染物，相對氨氮平均(2.10 mg/L)濃度就較高，造成觀測期間發現大量養殖

魚死亡，魚塢現有 4 套曝氣系統，可保持水質溶氧大於 2.35 mg/L，但仍無法充分降低氨氮的濃度，連帶的也發現亞硝酸鹽氮和硝酸鹽氮的監測濃度結果偏高，其中亞硝酸鹽氮的平均濃度高達 12.03 mg/L，由現場魚塢養殖廢水的監測結果可以知道水中主要的汙染物是含氮的營養鹽類所造成的。

表 3 魚塢養殖廢水水質特性監測結果

統計 參數	監測參數							
	T	pH	DO	BOD	TP	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	NO ₂ ⁻ -N
平均值	31.1	7.58	3.22	2.52	0.18	2.10	2.82	12.03
最大值	32.7	8.66	4.14	4.36	0.43	4.99	4.45	23.97
最小值	29.7	7.04	2.35	1.25	0.09	0.03	1.57	2.27

註：T 的單位為℃、pH 無單位、其餘單位都是 mg/L

由於魚塢養殖廢水所含有的營養物質很豐富，所以水色呈現深綠色，顯示水中就存有大量的藻類，我們也對水中原生藻類的油脂含量進行採樣分析，總脂質含量百分比約介於 12.6 % ~ 51.2 %，平均值為 38.0 %，與柵藻(*Scenedesmus dimorphus*)的總脂質含量百分比 16 % ~ 40 % 差不多，比小球藻(*Chlorella vulgaris*)的總脂質含量百分比 40 % ~ 58 % 略低，顯示本專題所合作養殖魚塢的養殖廢水中就含有豐富總脂質含量百分比的脂藻。

至於本專題原先所設定的培養之藻類為小球藻(*Chlorella vulgaris*)及柵藻(*Scenedesmus dimorphus*)，則發現培養初期非常不穩定，培養期間約在第 80 天 *Scenedesmus dimorphus* 開始出現淡綠色的藻色接著轉為綠色，但約在第 130 天藻色開始由穩定期邁向死亡期(藻色呈現白濁)。*Chlorella vulgaris* 培養過程中情況不樂觀，當更換新的培養基，藻色只會短暫出現淡綠色後就邁向死亡期。由此情況可知，對於 *Chlorella vulgaris* 的培養應加快更換培養基的速度。本專題亦將培養基直接更換經過濾除藻的魚塢養殖廢水進行小球藻(*Chlorella vulgaris*)及柵藻(*Scenedesmus dimorphus*)的測試培養，顯示用魚塢養殖廢水來培養油脂藻類尚需深入探討培養技術及適用油脂藻類。

五、結論

本專題對魚塭養殖廢水水質的監測結果分別為水溫 29.7~32.7°C；pH 值介於 7.04~8.66；溶氧約介於 2.35mg/L~4.14mg/L；總磷約介於 0.09mg/L~0.43mg/L；氨氮約介於 0.03mg/L~4.99mg/L；亞硝酸鹽約介於 2.27mg/L~23.97mg/L；硝酸鹽氮約介於 1.57mg/L~4.45mg/L，顯示水中的主要的污染物是含氮的營養鹽類。而此環境頗適於藻類的繁殖，由水中原生藻類的總脂質含量百分比的平均值為 38.0%，頗值得深入探討開發。至於本專題所選用的小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 及柵藻 (*Scenedesmus dimorphus*) 則沒有馴養完成。

六、參考文獻

1. 劉清標，2000，海洋微藻 *Isochrysis sp.* CCMP 1324 超微細結構與不飽和脂肪酸之生成，國立臺灣大學農業化學研究所博士論文。
2. 吳佩芬，「利用本土淡水藻類產製生質柴油之可行性評估」，逢甲大學環境工程與科學學系碩士論文，(2006)。
3. 台灣綜合研究院，「國際生質柴油推展之初步探討」專題分析報導，石油市場雙週報，2007年1月。
4. 工研院產業經濟與趨勢研究中心，能源政策白皮書，2007年10月。
5. 賴霽蓉，「台灣本土魚塭微藻之型態與18SrDNA親緣關係的研究」，嘉南藥理科技大學生物科技系碩士論文，(2010)。
6. 王姿月，「油脂藻 *Botryococcus braunii* 與 *Chlorella vulgaris* 生長特性之研討」，逢甲大學環境工程與科學學系碩士論文，(2009)。
7. Converti A., Casazza A. A., Ortiz E.Y., Perego P. and Del Borghi M., 2009, Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, Chem. Eng. Process, 48:1146-1151.
8. Cepak V. and Lukavsky J., 1994, The effect of high irradiances on growth, biosynthetic activities and the ultrastructure of the green alga *Botryococcus braunii* strain Droop 1950/807-1, Arch. Hydrobiol.

Suppl., 102: 115-115.

9. Hall, D. O., 1997, Biomass energy in industrialized countries - A view of the future, *Forest Ecol. Mgmt.*, 91:17-45.
10. Illman, A. M., Scragg, A. H. & Shales, S. W., 2000, Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium, *Enzy. Microbial Technol.*, 27: 631-635.
11. Kosaric, N. & Velikonja, J., 1995, Liquid & gaseous fuels from biotechnology: challenge and opportunities, *FEMS Microbiol. Rev.* 16:111-142.
12. Ratledge, C., 1989, Biotechnology of oil and fats, In *Microbial Lipids*, Vol. 2, Edited by Ratledge, C. & Wilkinson, S. G., Academic Press, London.
13. Ratledge, C., 1993, Single cell oils--have they a biotechnological future? *Trends Biotechnol.*, 11(7):278-284.
14. Scragg, A. H., Illman, A. M., Carden, A. & Shales, S. W., 2002, Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor, *Biomass Bioenergy*, 23: 67-73.
15. Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J. & Roessler, P., 1998, A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program-biofuel from algae, National Renewable Energy Laboratory, DOE, Colorado.
16. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. and Isambert A., 2006, Commercial applications of microalgae, *J. Biosci. Bioeng.*, 101: 87-96.
17. Takagi, M. Karseno and Yoshida, T. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and Triacylglyceride in marine Microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 223-226.
18. Tortora G. J., Funke B. R. and Case C. L., 2005, *Microbiology: An Introduction*, Pearson Benjamin Cummings, California, 349.