

行政院原子能委員會
委託研究計畫期末報告

超臨界 PHA 純化萃取製程技術之開發

**Evaluation on the technical feasibility of pilot-scale supercritical fluids
extraction of PHA from different strains**

計畫編號：108B018

受委託機關(構)：財團法人金屬工業研究發展中心

計畫主持人：陳綺慧

聯絡電話：07-3513121 #2634

E-mail address：josephine@mail.mirdc.org.tw

核研所聯絡人員：周聖炘

報告日期：109 年 02 月 26 日

目錄

目錄.....	I
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
壹、計畫緣起與目的.....	3
貳、研究方法與過程.....	4
參、主要發現與結論.....	12
肆、參考文獻.....	22

中文摘要

PHA 為一生物高分子聚合物，由菌株培養所產生的 PHA 係以脂粒型態累積在細胞質內，因此增加 PHA 提取難度及成本。目前文獻中提及的 PHA 回收方法，仍多使用有機溶劑從細胞中提取聚合物，其中最多是以氯仿或二氯甲烷等具毒性有機溶劑進行萃取，不利於生質材料商業化開發應用。近年來超臨界流體萃取法是令人矚目的發展方向，本計畫使用超臨界流體萃取法，使用超臨界二氧化碳、液化氣體(丙烷或 R-134a)為工作流體，進行 PHA 與脂肪酸超臨界流體萃取技術之可行性評估及試量產規模萃取技術測試，藉以與既有溶劑法為主的生產方法有所區隔，增加競爭優勢。

英文摘要

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are a class of biopolymers and accumulated in the form of granules in the microbial cytoplasm. Intracellular accumulation of PHAs and a relatively low content of product can result in a high recovery cost. Several methods have been attempted to extract and purify PHAs. Solvent extraction is the most extensively adopted method to isolate PHAs from the microbial cells. Extraction of PHAs with toxic solvents such as chlorinated hydrocarbons is used routinely in the laboratory but the large-scale application of such solvent extraction is not environmentally friendly. Supercritical fluid extraction (SFE) is now frequently used to extract lipids from many materials. In this project, supercritical carbon dioxide and liquefied propane (or liquefied R-134a) will be used as the extracting solvents. The objective of this project is to evaluate the technical feasibility of pilot-scale supercritical fluid extraction of PHAs and medium-chain fatty acids from different strains. Consequently, a more environmentally friendly and efficient PHAs recovery technique based on SFE will be developed to replace the conventional solvent extraction methods in the future.

壹、計畫緣起與目的

由菌株培養所產生的 PHA 係是累積在細胞質內的高分子聚合物，以脂粒的型態累積，因此若要從菌體中得到高純度或高回收率的高分子，其效率會隨著前處理及萃取方式而有所不同。PHA 萃取技術會依據產品應用而決定 PHA 純度，例如在醫療應用中，PHA 絕對必須不含細菌內毒素和其他污染性化學品和溶劑；另一方面，如果 PHA 用於覆蓋薄膜或垃圾袋等應用，則可以接受較低的純度技術；像酵素萃取技術是一種比溶劑萃取更環保的方法，但獲得的聚合物純度較低（約 90%），針對生物醫學應用要求最終純度為 99% 或更高，則或許仍需要使用溶劑萃取進行第二次純化，才可達到生醫材料等級。目前文獻中所提及的 PHA 回收方法，仍多使用有機溶劑從細胞中提取聚合物，其中最多是以氯仿或二氯甲烷等具毒性有機溶劑進行萃取，這是一種在經濟效益前提下不適用於工業大規模生產的方法，而其他如添加次氯酸鈉、機械性萃取、高壓均質法等方式，雖具有可行性，但卻會破壞 PHA 結構，導致原始 PHA 分子量變小。近年來綠色萃取技術（超臨界流體萃取法）是令人矚目的發展方向，例如以超臨界二氧化碳、液化氣體（丙烷或 R-134a）為工作流體進行萃取。超臨界 CO₂ 有高密度和低黏度特性，具有之優點包含不燃性、低毒性和中等臨界溫度和壓力（約 31.1°C 和 73.8bar），文獻指出超臨界流體具萃取 PHA 潛力^[1]，雖初期設置成本較高，但未來較有機會達到量產操作目標。

貳、研究方法與過程

一、PHA 生產菌株之超臨界二氧化碳萃取技術

目前從菌株內提取聚羥基脂肪酸酯(PHA)等脂肪酸酯的方法主要為溶劑萃取法^[2]，氯仿作為萃取劑常被用於實驗室萃取 PHA 等脂肪酸酯，其萃取效果好且對分子量影響小，但毒性高不利於商業化大規模使用。本計畫採用的超臨界流體萃取是一種新的分離技術，所謂超臨界狀態是指物質的溫度、壓力均處於其臨界溫度和臨界壓力之上，其性質介於氣體和液體之間，以單相形式存在之一種流體狀態，此時具低表面張力、低黏度、高擴散性與高質傳效率等特點。目前已見使用超臨界狀態的二氧化碳或亞臨界狀態的其他工作流體(例如丙烷、四氟乙烷等)作為萃取劑，由於這類工作流體具低極性關係，在萃取標的物的選擇上特別適合萃取脂溶性成分，且萃取後利用相變化從超臨界狀態回到氣態即可避免殘留於萃取物，有利於標的物分離。另外，也容易選用合適溶劑作為輔溶劑使用，藉此調整工作流體極性以提升萃取效率。因此，本研究以超臨界二氧化碳作為萃取劑，並添加合適輔溶劑，以達到萃取純化 PHA 目的。

實驗型萃取系統部分係採用金屬工業研究發展中心 360bar x 500mL 等級超臨界二氧化碳萃取設備，系統詳見圖 1，其細部規格詳見表 1 說明。二氧化碳之臨界壓力約為 73.8bar、臨界溫度約為 31.1°C，一般於超臨界態操作範圍下進行萃取操作。本期測試使用之系統最大操作壓力為 360bar、最高操作溫度為 80°C，本實驗型機台無設置二氧化碳回收系統。



圖 1、實驗型超臨界二氧化碳萃取設備

表 1、實驗型超臨界二氧化碳萃取系統規格

項目	規格
工作壓力(max.)	360 bar
工作溫度(max.)	80 °C
CO ₂ 額定流量(max.)	8 LPH
萃取籃容積	三種規格 130mL/250mL/500mL
分離槽容積	150mL

PHA 生產菌株體將採用超臨界二氧化碳萃取方法進行乾式萃取，由核研所提供測試用乾燥原料，利用超臨界二氧化碳高滲透及低表面張力等特性進行 PHA 萃取可行性評估。為了解 PHA 於超臨界二氧化碳溶解程度，透過一高壓視窗觀察 PHA 溶解情況，該視窗上方及前方設有玻璃，玻璃設計耐壓 350bar、耐溫 80°C，

因此實際操作時可由上方照射光源，從前方進行觀測，或從前方照射光源，從上方觀測，詳見圖 2。將視窗槽外接超臨界二氧化碳供應系統，當超臨界二氧化碳注入視窗後，透過背壓閥控制欲測試之壓力(100~300bar)；溫度則透過外接熱水供應系統，控制在測試溫度(40~60°C)。另外，也直接添加不同輔溶劑(10~20%)於視窗中，測試包括乙醇、乙酸乙酯、丙酮、碳酸二甲酯，藉以作為萃取輔溶劑選用參考。參考視窗觀測結果，添加輔溶劑，進行超臨界二氧化碳萃取，詳見圖 3。

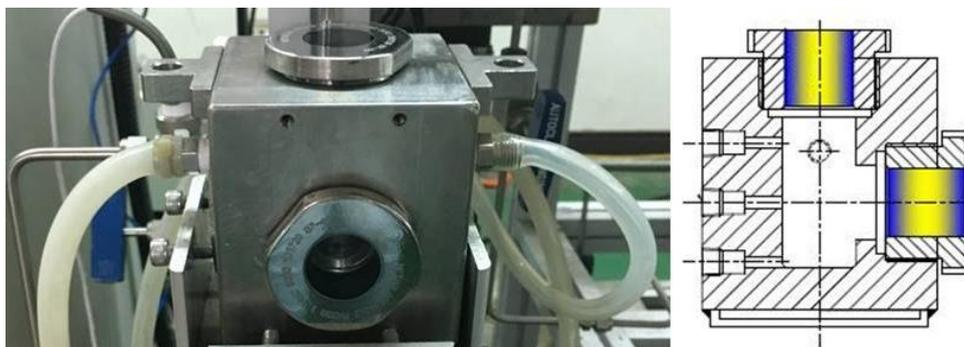


圖 2、高壓視窗槽及內部示意圖



圖 3、填料及進行超臨界二氧化碳萃取

二、脂肪酸生產菌株之液化丙烷萃取技術

目前商業上多使用有機溶劑萃取脂肪酸，使用溶劑包括丙酮、四氫呋喃、醚類、醇類、烴類(正己烷、氯仿)等，萃取後必須將有機溶劑分離，後續處理時間長、效率低且有廢溶劑毒性問題。比較環保且效率高的是超臨界流體萃取法^[3-4]，但因為超臨界二氧化碳在水中溶解度高，菌體若無先進行凍乾等乾燥處理，許多水分會伴隨脂肪酸被超臨界二氧化碳萃取出來，由於濕菌體往往含水量極高，相當於萃取前段為萃取水的動作，等大部分水分被萃出後，始見脂肪酸逐漸被萃出，因此萃取時間長，此方法雖無有機溶劑分離問題但得再進行油水分離。曾有萃取動力學研究指出，萃取前 4~6 小時實為水分萃取，此後之萃取行為才趨近於乾粉萃取。另一方面，超臨界二氧化碳萃取操作壓力通常在 30~70MPa，設備購置成本相對較高。除此之外，國內外也有不少研究以醇類為主要萃取劑，藉由二氧化碳膨脹醇類方法提高萃取效率^[5-7]。

萃取測試係直接以濕菌體為原料，為有效提取酵母菌胞內中長鏈脂肪酸，嘗試利用操作壓力較超臨界二氧化碳低且親脂性的壓縮氣體液化丙烷作為萃取劑，將液化丙烷增壓至操作壓力，並分別設定萃取槽溫度、分離槽溫度、萃取劑流量、輔溶劑流量、轉速等實驗參數，達到操作條件後進行脂肪酸萃取，萃取特定時間後，透過降壓分離脂肪酸及丙烷，並將丙烷回收至再使用。由於液化丙烷為短鏈烴類具低極性特性，在萃取標的物的選擇上較適合萃取中長鏈脂溶性成分，另外也可選用合適溶劑作為輔溶劑使用，調整工作流體極性以提升萃取效率。從核研所提供

該生產菌株脂肪酸於不同溶劑萃脂結果，詳見圖 4，發現單以低極性溶劑正己烷對脂肪酸萃脂效果差，但正己烷-甲醇或正己烷-乙醇作為萃取劑時，可明顯提高萃取效果，醇類溶劑對此類脂肪酸溶解好，因此建議萃取溶劑系統中應添加適量極性溶劑，尤其是乙醇，會有助於液化丙烷對脂肪酸萃取。

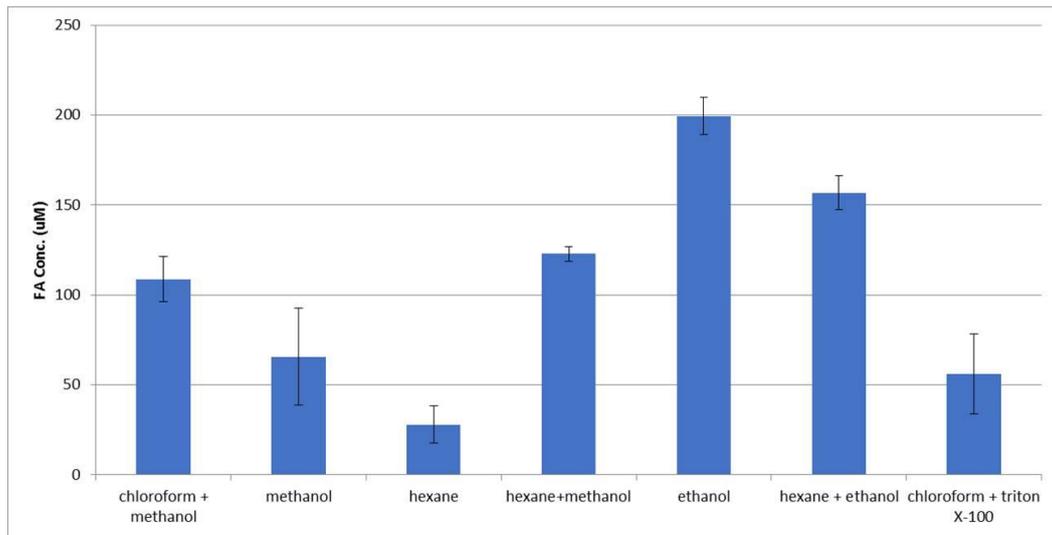


圖 4、核研所生產菌株脂肪酸於不同溶劑萃脂結果

萃取系統係採用金屬工業研究發展中心 50bar x 2L 等級液化氣體萃取設備，液化丙烷萃取系統詳見圖 5，細部規格詳見表 2 說明。丙烷之臨界壓力約為 42.4bar、臨界溫度約為 96.8°C，一般於亞臨界液態操作範圍下進行萃取操作。本期測試使用之液化丙烷萃取系統最大操作壓力為 50bar、操作溫度為 25~80°C，本系統另外設有丙烷回收系統，可將丙烷回收再度使用，有利於降低生產成本。



圖 5、試驗型 2L 萃取設備

表 2、試驗型液化丙烷萃取系統規格

項目	規格
工作壓力(max.)	50 bar
工作溫度(max.)	80 °C
丙烷額定流量(max.)	10 LPH
輔溶劑額定流量(max.)	2 LPH
萃取籃容積	2 L
分離槽容積	2 L
其他規格	具丙烷回收系統(20L)、上蓋活動式內槽。符合 CNS9788 壓力容器規範、CNS3376 防爆電器規範。

為評估液化丙烷萃取脂肪酸可行性，以萃取壓力 40bar、溫度 50~80°C進行

萃取步驟確效，測試萃取流程(無前處理/不同前處理)、原料處理(含水率/破菌/未破菌)、輔溶劑必要性等，與溶劑萃取比較作為萃取效率初步判定基準，將萃取效率較佳萃取物及萃餘物寄至核研所進行脂肪酸分析，依據分析結果評估萃取方法。

由核研所提供未破菌酵母菌濕菌及高壓破菌酵母菌濕菌，未破菌濕菌含水率約 60~75%，詳見圖 6，呈現泥膏狀，以顯微鏡鏡檢可觀察到完整細胞，高壓破菌濕菌含水率約 90~95%，詳見圖 7，呈現濃液狀，鏡檢可觀察到已不見完整細胞，細胞碎片分散。測試時先秤取濕菌分別不作任何處理或添加分析級甲醇(或乙醇)進行濕菌前處理，前處理目的在於降低濕菌黏度及提升後續丙烷萃取協同作用，醇類及濕菌乾重比約 0.5~1:1 (v:w)，詳見圖 8，此時加醇濕菌含水率為略為提高至 65~75%，呈現較易流動狀態。

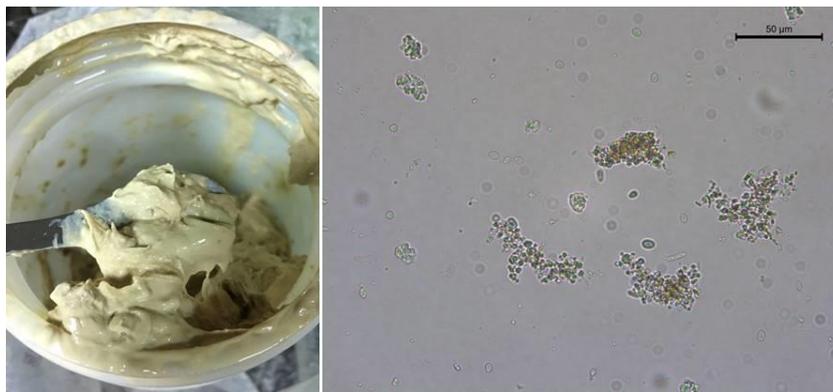


圖 6、未破菌酵母菌濕菌

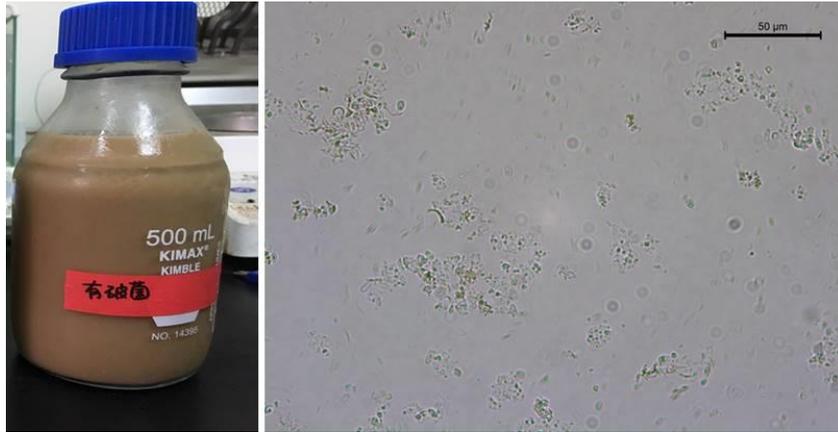


圖 7、高壓破菌酵母菌濕菌



圖 8、加醇未破菌濕菌(左)、加醇高壓破菌濕菌(右)

將無加醇濕菌或加醇濕菌進料裝填至萃取籃，再將萃取籃放入萃取槽並上蓋鎖緊，排除系統內空氣，之後依實驗條件設定萃取槽壓力 40bar 及溫度 50°C~80°C、丙烷流量 8LPH~10LPH、輔溶劑流量 0.5~0.6LPH、轉速 100rpm~300rpm、分離槽壓力約 9bar、溫度約 55°C，之後以靜、動態萃取方式進行脂肪酸提取，每 30 分鐘從分離槽收集，至無法收集到萃取物為止，萃取樣品交由核研所成分分析。由於無法得知每批濕菌原料含油率，因此測試萃取率計算方法採式 1 表示：

$$\text{萃取率(\%)} = (\text{萃取物重量} / \text{濕菌進料乾重}) * 100\% \quad (\text{式 1})$$

參、主要發現與結論

一、PHA 生產菌株之超臨界二氧化碳萃取測試結果

(一)超臨界二氧化碳溶解 PHA 測試

秤取可觀測量 PHA(約 0.75g)置於視窗，詳見圖 9，溫度 40°C下注入二氧化碳，分別於 100bar、150bar、200bar、250bar、300bar 持壓靜置 3 分鐘，從前視觀察 PHA 無任何巨觀變化，PHA 無法溶解於超臨界二氧化碳中。習知萃取 PHA 的溶劑(例如氯仿、丁醇等)大多具弱極性，因此萃取 PHA 須添加具極性輔溶劑提高超臨界二氧化碳極性。

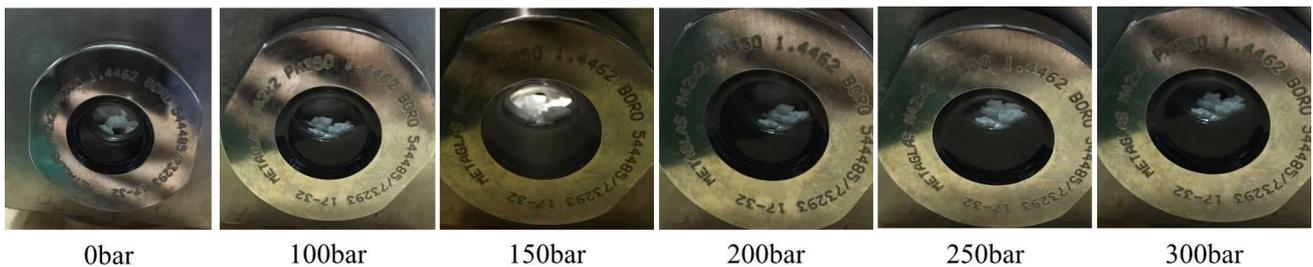


圖 9、視窗觀測 PHA 於超臨界二氧化碳變化

(二)超臨界二氧化碳及乙醇輔溶劑溶解 PHA 測試

秤取視窗可觀測量 PHA(約 0.75g)置於視窗，添加 15ml 食品級 95%乙醇至視窗，詳見圖 10，溫度 45°C下注入二氧化碳，分別於 100bar、150bar、200bar、250bar、300bar 持壓靜置 3~5 分鐘，從前視及上視觀察，PHA 有些微溶脹現象但無任何溶解表徵，當延長超臨界二氧化碳浸泡時間，於 200bar 靜置 30 分鐘亦無顯著變化。

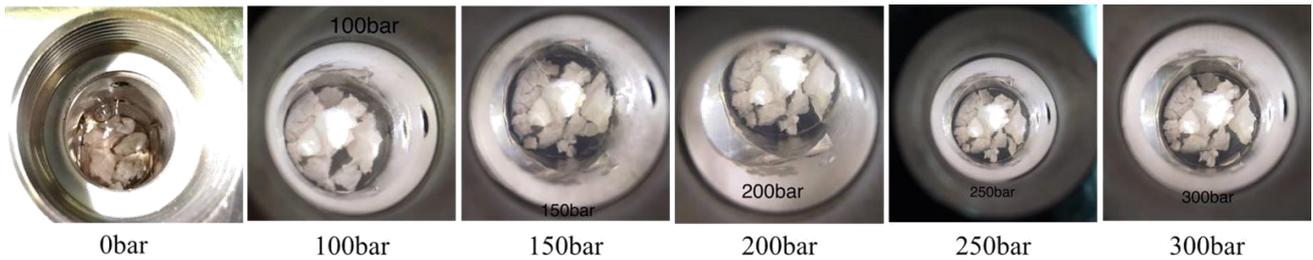


圖 10、視窗觀測 PHA 於乙醇及超臨界二氧化碳變化

(三)超臨界二氧化碳及乙酸乙酯輔溶劑溶解 PHA 測試

秤取視窗可觀測量 PHA(約 0.75g)置於視窗，添加 15ml 乙酸乙酯至視窗，詳見圖 11，溫度 60°C下注入二氧化碳，分別於 100bar、200bar、300bar 持壓靜置 3~5 分鐘，分別從前視及上視觀察，PHA 無顯著變化。

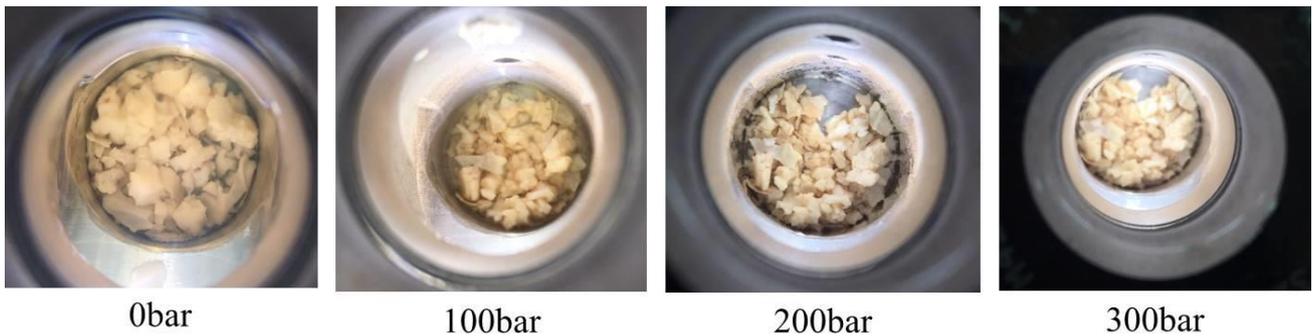


圖 11、視窗觀測 PHA 於乙酸乙酯及超臨界二氧化碳變化

(四)超臨界二氧化碳及丙酮溶劑溶解 PHA 測試

秤取視窗可觀測量 PHA(約 0.75g)置於視窗，添加 15ml 丙酮至視窗，詳見圖 12，溫度 60°C下注入二氧化碳，分別於 100bar、200bar、300bar 持壓靜置 3~5 分鐘，分別從前視及上視觀察，PHA 有些微溶解使視窗產生濁化現象，洩壓後也觀察到 PHA 顆粒變小，推測短時間內有部分溶解及卸壓後再沉澱，如圖 13 所示。

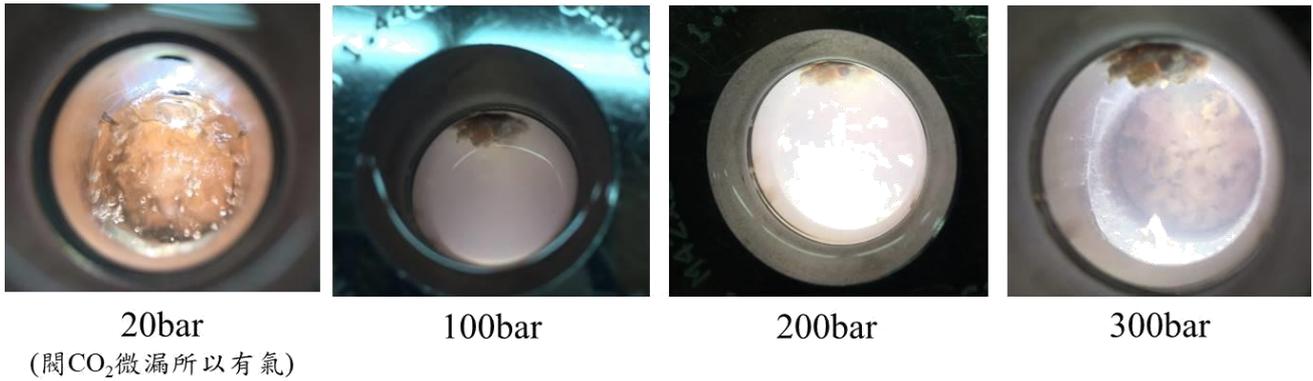


圖 12、視窗觀測 PHA 於丙酮及超臨界二氧化碳變化

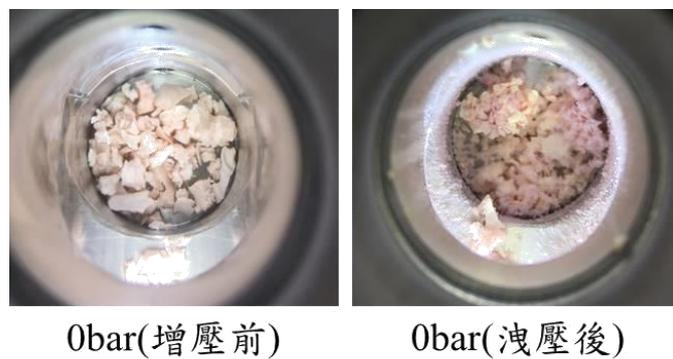


圖 13、視窗觀測 PHA 於添加丙酮測試前後變化

(五)超臨界二氧化碳及碳酸二甲酯溶劑溶解 PHA 測試

秤取視窗可觀測量 PHA(約 0.75g)置於視窗，添加 15ml 碳酸二甲酯至視窗，詳見圖 14，溫度 60°C下注入二氧化碳，分別於 100bar、200bar、300bar 持壓靜置 3~5 分鐘，分別從前視及上視觀察，相較於前述輔溶劑，PHA 於 100bar 溶解情況更顯著，導致視窗玻璃嚴重濁化，當增壓至 200bar 之後，由於目前視窗槽添加輔溶劑方式係以預加入模式，其後注入超臨界二氧化碳建壓時會將部分輔溶劑排出，因此碳酸二甲酯隨 CO₂ 注入損失，造成溶解度下降因此再次沉澱。



圖 14、視窗觀測 PHA 於碳酸二甲酯及超臨界二氧化碳變化

低分子脂質(C₁₈ 以下)通常可溶解於超臨界二氧化碳 150~300bar 操作範圍，但根據視窗測試觀察結果，高分子 PHA 於超臨界二氧化碳 100~300bar 條件下無法溶解，說明輔溶劑添加的必要性。由於超臨界二氧化碳無法溶解 PHA，國外文獻萃取中鏈 PHA (MCL-PHA)方法分成兩步驟，第一步以超臨界二氧化碳萃取菌體非 PHA 脂質^[8]，於超臨界二氧化碳 5000psi、60°C下可於 1 小時萃取 84.3%非 PHA 脂質，第二步再以氯仿完成菌體 PHA 的萃取純化。另外，當 P(3HB)濃度超過 5% (W/V)時，將因 PHA 高黏度問題增加萃取微生物 PHA 難度^[9]。有關於輔溶劑的選用，從視窗測試結果顯示，超臨界二氧化碳萃取方法常用的乙醇、乙酸乙酯輔溶劑無法有效溶解 PHA。如圖 15 所示，文獻曾研究利用 90°C碳酸二甲酯 (DMC)萃取 4 小時回收凍乾微生物中的 P(3HB)成分，其效果較 90°C碳酸二乙酯 (DEC)、90°C碳酸丙烯酯(PC)、80°C乙酸乙酯(AcOEt)更佳，接近 50°C二氯甲烷 (CH₂Cl₂)^[10]，從視窗測試結果亦發現，超臨界二氧化碳添加碳酸二甲酯對於 PHA 有較佳溶解情況，高極性丙酮由於容易損壞一般密封圈材質不建議使用，因此，

將選用碳酸二甲酯作為超臨界二氧化碳萃取微生物 PHA 的輔溶劑，於超臨界二氧化碳 300bar、60°C 下萃取 PHA 生產菌體非 PHA 溶解物，再添加碳酸二甲酯作為輔溶劑萃取 PHA 產物。

Figure 1. P(3HB) recovery (expressed as percentage of the polymer content in the cells) obtained after 4 h-extraction of freeze-dried biomass with DMC, DEC, PC, AcOEt and CH₂Cl₂.

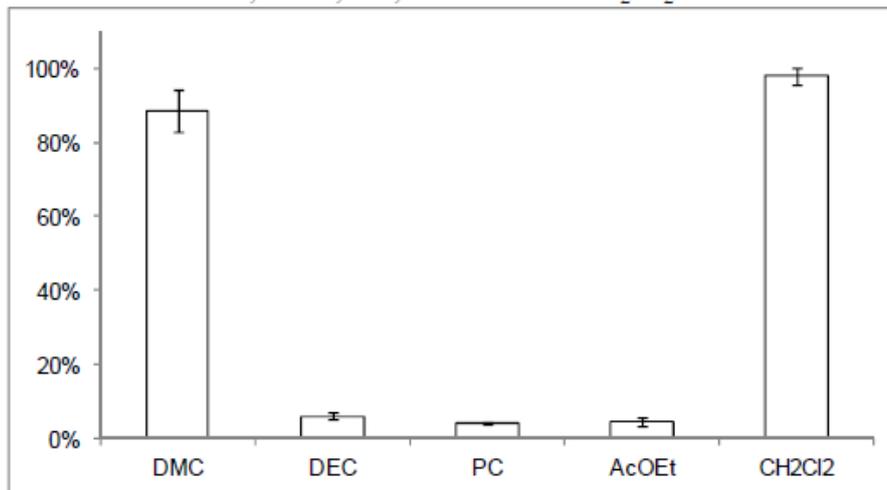


圖 15、文獻有機溶劑萃取 P(3HB) 結果^[10]

(六) 超臨界二氧化碳及碳酸二甲酯溶劑萃取 PHA 測試

超臨界二氧化碳及碳酸二甲酯溶劑萃取 PHA 測試中，超臨界二氧化碳壓力為 250bar、溫度 60°C，添加碳酸二甲酯約 10%，收集槽壓力為 50bar、溫度為 65°C，萃取 2 小時，萃取結果詳見圖 16。

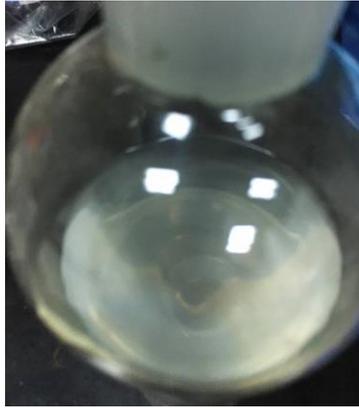


圖 16、超臨界二氧化碳萃取物

二、脂肪酸生產菌株之液化丙烷萃取測試結果

(一)脂肪酸生產菌株無前處理萃取測試

未破菌酵母菌濕菌約 560g(含水率約 72%)以丙烷壓力 40bar、溫度 50°C、流量 10LPH、轉速 100rpm 進行萃取，每 30 分鐘僅收集到萃取物約 0.2~0.3g，由於收集量少，因此於萃取 2 小時後提高溫度至 60°C，收集量略有提升，但每 30 分鐘仍僅收集到萃取物約 0.4~0.5g，總共萃取 4 小時萃取率約 2.2%，萃餘物含水率約 74%，詳見圖 17。從結果可發現水分的存在阻礙液化丙烷進入未破菌酵母菌濕菌細胞內，不易將細胞內脂肪酸萃取出來，因此建議採用液化丙烷-醇類共溶劑方式，利用醇類與水互溶性，相對容易進入濕菌體細胞內萃取油脂，與液化丙烷接觸後透過脂肪酸在醇類及液化丙烷間重新分配，將脂肪酸轉移至液化丙烷，提高萃取效率。

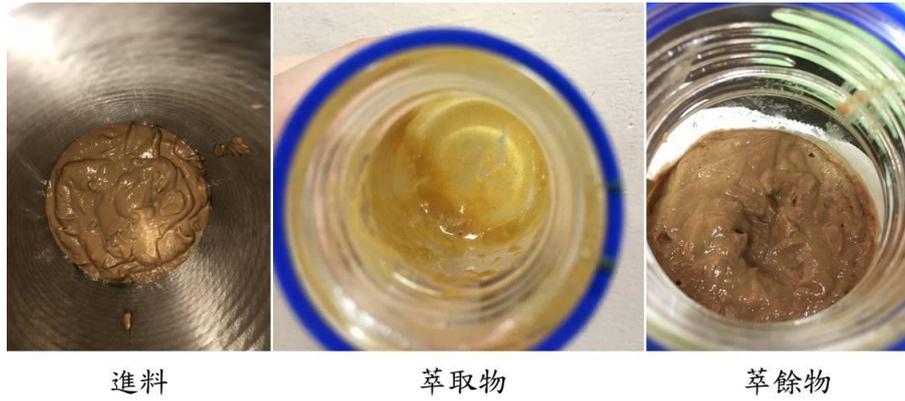


圖 17、液化丙烷萃取未破菌濕菌

(二)破菌脂肪酸生產菌株無前處理萃取測試

高壓破菌酵母菌濕菌含水率約 95%，由於含水率高呈溶液狀態，因此對高壓破菌液進行離心(6,000rpm、10 分鐘)移除上清液，詳見圖 18，此時濕菌體約 90g、含水率約 67%，之後以丙烷壓力 40bar、溫度 50°C、流量 10LPH、轉速 100rpm 進行萃取 4 小時，萃取率約 1%。採高壓均質破菌時，若菌液濃度太高會影響破菌效果，因此多會稀釋進料，所以菌體高壓破菌後含水率高，但含水率太高會形成水屏障阻礙萃取劑與脂肪酸接觸機會；另一方面，因細胞已近乎完全破碎，推測離心移除液體時脂肪酸也易脫離濕菌體，受離心力轉移至上清液，因此不適合透過離心方式降低濕菌含水率。



圖 18、高壓破菌酵母菌濕菌原料離心處理

(三)脂肪酸生產菌株醇前處理萃取測試

以未破菌酵母菌濕菌為原料，以丙烷壓力 40bar、溫度 50~60°C、流量 8~10LPH、轉速 300rpm 進行萃取 2 小時。結果顯示，添加醇可提升濕菌進料流動性，萃取出物通常不含醇液，為高濃度脂肪酸萃取出物，但當醇液添加較多使進料含水率 70% 以上時，萃取出物通常會伴隨少量醇液。不含醇液的高濃度脂肪酸萃取出物，其萃取 2 小時萃取率約 2~3%，詳見圖 19，相較於前述無加醇萃取測試結果，加醇可縮短萃取時間及提高萃取效率。



圖 19、無破菌濕菌(醇前處理)脂肪酸萃取出物

另一方面，為比較丙烷萃取效率，將同樣加醇濕料以其他種類之有機溶劑進行萃取，利用有機溶劑乙醇及正己烷等量混合溶劑作為萃取劑攪拌萃取 4 小時後，萃取率僅約 1~1.5%。

(四)破菌脂肪酸生產菌株醇前處理萃取測試

本期高壓破菌酵母菌濕菌含水率約 90%，因含水率高仍呈溶液狀態，前述測

試結果已發現高含水率高壓破菌酵母菌濕菌不適合以離心方式移除水，會將脂肪酸一併移除至上清液，因此改將酵母菌濕菌冷凍乾燥處理 1 日，含水率降至約 72%，此時破菌濕菌已出現明顯酸臭不良味道。之後採用第一種加醇萃取方式添加乙醇，並於丙烷壓力 40bar、溫度 60°C、流量 10LPH、轉速 300rpm 條件下進行萃取 2 小時，萃取出含醇液，詳見圖 20，破菌後萃取效率並無顯著提升。



圖 20、高壓破菌酵母菌濕菌液化丙烷萃取出物

(五)脂肪酸生產菌株添加醇輔溶劑萃取測試

本測試採用兩段式萃取方式，先以醇前處理之後於萃取過程添加適量醇類作為輔溶劑，實際作法係於萃取系統外添加乙醇前處理，進行液化丙烷萃取 2 小時後，再添加乙醇萃取 1 小時。第一段萃取程序類似第(三)部分之醇前處理萃取方式，因此可收集到不含乙醇的高濃度脂肪酸萃取出物，詳見圖 21(左)，但在第二段萃取程序因為是於液化丙烷萃取過程添加乙醇作為輔溶劑，其透過輔溶劑泵以 0.5LPH 流量動態注入丙烷萃取系統內，因此收集到萃取出物含大量乙醇，詳見圖 21(右)，需進一步減壓濃縮移除乙醇才能獲得高濃度脂肪酸。



圖 21、無破菌濕菌(輔溶劑)脂肪酸萃取物：(左)第一段、(右)第二段

另外嘗試以類似醇膨脹液化丙烷萃取概念，於萃取系統內以乙醇萃取 0.5 小時，再進行液化丙烷萃取，並於液化丙烷萃取 0.5 小時後於添加乙醇再萃取 1 小時，此作法收集到之萃取物都含乙醇，其第一段萃取程序是透過乙醇溶劑泵以 0.5LPH 流量注入萃取系統內，相當於以乙醇先萃取半小時，之後再注入液化丙烷建壓進行動態萃取，因此收集到萃取物也含乙醇，詳見圖 22(左)。液化丙烷萃取半小時後，先進行一次收集，之後再繼續以 0.5LPH 流量添加乙醇輔溶劑，萃取 1 小時，但此時萃取物之脂肪酸濃度低，詳見圖 22(右)，可能是因為可溶出的脂肪酸大多於前 1 小時被萃出。

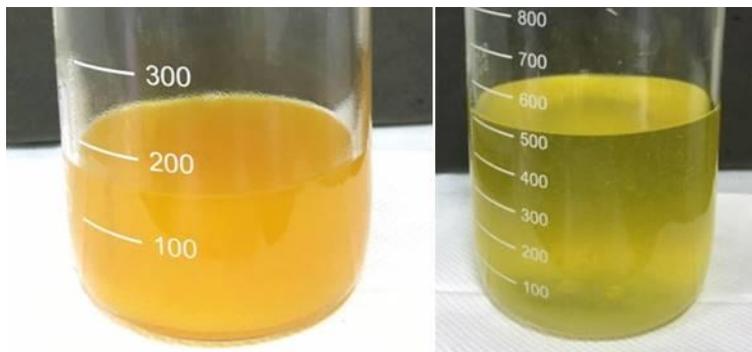


圖 22、無破菌濕菌(輔溶劑)脂肪酸萃取物：(左)第一段、(右)第二段

肆、参考文献

1. Jeremy Javers, William R. Gibbons, Chinnadurai Karunanithy, Polyhydroxyalkanoate Production by *Pseudomonas putida* KT217 on a Condensed Corn Solubles Based Medium Fed with Glycerol Water or Sunflower Soapstock, *Advances in Microbiology*, 2012, 2, 241-251.
2. Maria R. Kosseva, Edy Rusbandi, Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107, 762-778.
3. Hanifa Taher, Sulaiman AI-Zuhair, Ali H. AI-Marzouqi, Yousef Haik, Mohammed Farid, Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production, *Biomass and Bioenergy*, 2014, 66, 159.
4. Hanifa Taher, Sulaiman AI-Zuhair, Ali H. AI-Marzouqi, Yousef Haik, Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipid, 2014, 86, 57.
5. Hsin-Chih Wang, Worasaung Klinthong, Yi-Hung Yang, Chung-Sung Tan, Continuous extraction of lipids from *Schizochytrium* sp. by CO₂-expanded ethanol, *Bioresource Technology*, 2015, 189, 162.
6. Yi-Hung Yang, Worasaung Klinthong, Chung-Sung Tan, Optimization of continuous lipid extraction from *Chlorella vulgaris* by CO₂-expanded methanol for biodiesel production, *Bioresource Technology*, 2015, 198, 550.
7. Philip G. Jessop, Pascale Champagne, Roland Lee, Extraction of products from algae using green solvents, 5th International Congress on Green Process Engineering (GPE 2016).
8. J. W. Hampson and R. D. Ashby, Extraction of lipid-grown bacterial cells by supercritical fluid and organic solvent to obtain pure medium chain-length polyhydroxyalkanoates, *JAOCs*, 1999, 76, 1371.
9. B. Kunasundari, K. Sudesh, Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates, *eXPRESS Polymer Letters*, 2011, 5, 620.

10. Chiara Samorì, Marina Basaglia, Sergio Casella, Lorenzo Favaro, Paola Galletti, Loris Giorgini, Davide Marchi, Laura Mazzocchetti, Cristian Torri, Emilio Tagliavini, Dimethyl carbonate and switchable anionic surfactants: two effective tools for the extraction of polyhydroxyalkanoates from microbial biomass, *Green Chem.*, 2015, 17, 1047.