

生質酒精之製作

1-1 前言

目前國內在生質物資材中，除廢食用油再利用執行中外，其它生質資材的開發包括藻類、大豆、油菜、甘藷等等，卻因生物放大、土地問題、成本及造成食材原物料漲價等等問題存在，仍需解決。而以表面流式為主的人工濕地自然淨化工法來進行河川水質的淨化處理，陸續在全台各地建置完工並進行操作運轉的案例已超過50處以上，系統完工保固後，因台灣日照強，氣溫適宜，在人工濕地內植物生長快速且過密，導致蚊蚋滋生，在水生植物體的應用上，國內僅針對污染物的削減率、最適草種評選等維護管理的瞭解(駱, 2004；陳, 2005；施, 2006)，對於發展生質能源則鮮少有相關文獻的研究出現。Tag El-Din (1992)指出在高溫高濕的條件下，布袋蓮在幾天之內可以倍數來成長。Abdelhamid and Gabr(1991)估算出布袋蓮的產量可達每年每公頃140噸乾重。Ripley et al. (2006)指出布袋蓮的生長在低氮(2-0.2 mgL⁻¹)及磷(0.2-0.01 mgL⁻¹)的供給下會降低光合作用，當濃度達200 mg-NL⁻¹ 及20 mg-PL⁻¹ 則會促進生長及造成生物質量的累積，而人工濕地淨水後植物體當作生質物的優點，應不需額外施肥，尤其在南部人工濕地場址均設置於禽畜養殖盛行區，故有穩定豐富營養鹽的排入不需另外投入肥料。故人工濕地高產量之布袋蓮，如表2-3 (沈, 2006)，進行生質酒精產製之研發應是值得進行。

表1-1 酒精生產原料之生產量比較 (沈, 2006)

主要組成	生質作物	原料酒精轉化率	單位面積原料產量	單位面積酒精產量
		(公升/公噸 原料)	(公噸/公頃)	(公升/公頃)
糖質	甘蔗	80	65	5,200
	木薯	150	40	6,000
纖維素	乾草	340	9.1	3,100
	木材	300	12	3,500
纖維素及藻多醣	海藻	320	50(乾種)	16,000
纖維素	布袋蓮		140(乾種)	

表1-1 亦指出，海藻富含纖維素，江氏與殷氏(2006)回顧國外研究報告之指出，綠藻細胞壁組成視藻種與培養環境而異，除了纖維素外，主要為rhamnose 和 galactose，次為arabinose、glucose 和 xylose，並有glucosamine；Chlorella vulgaris K-22 細胞組成含有多量的 glucuronic acid 和 rhamnose [構成酸性多醣

glucuronorhamnan]，降解物含有 (α -D-glucopyranuronosyl-(1R3)-(α -L-rhamnopyranosyl- (1R2)-(α -L-rhamnopyranose，另亦有甲基化的rhamnose 殘基存在。江氏與殷氏(2006)並指出在Burczyk 等(1995)之研究發現，綠藻類的細胞壁結構大致可分成含有 acetolysis-resistant biopolymer (ARB) 和ketocarotenoids 的三積層結構(Trilaminar structure, TLS)與不含上述物質的白色結構兩種型態，視品種而異；小綠藻*C. vulgaris* 突變株的細胞壁不具有ARB 物質，其均質液的單醣組成主為rhamnose (佔49%)，次為arabinose (12%)及galactose (19%)，另少量糖類為glucose, mannose 和xylose (共約20%)；另有突變株細胞壁均質液之單醣組成則galactose (38%)高於rhamnose (27%)含量，次要單糖為mannose 及xylose (各約13 及15%)。比較另一小綠藻*C. fusca* 突變株具有ARB，其單糖組成則以mannose (47-75%)為主，次為glucose (4-27%)、rhamnose (2-16%)或fucose (1-23%)，其他的糖類殘基則微量。由此可知，不同藻源的細胞壁耐降解性不同，有必要鑑定細胞壁醣類組成及結構特性，藉以輔助選定目標酵素來降解綠藻細胞壁。

Tag El-Din (1992)指出在高溫高濕的條件下，布袋蓮在幾天之內可以倍數來成長。Abdelhamid and Gabr(1991)估算出布袋蓮的產量可達每年每公頃140 噸乾重。Ripley et al. (2006)指出布袋蓮的生長在低氮(2-0.2 mgL⁻¹)及磷(0.2-0.01 mgL⁻¹)的供給下會降低光合作用，當濃度達200 mg-N⁻¹ 及20 mg-PL⁻¹ 則會促進生長及造成生物質量的累積，而人工濕地淨水後植物體當作生質物的優點，應不需額外施肥，尤其在南部人工濕地場址均設置於禽畜養殖盛行區，故有穩定豐富營養鹽的排入不需另外投入肥料。故以人工濕地高產量之布袋蓮，如表2 (沈, 2006)，進行生質酒精產製之研發應是值得進行。

但本次研究重點主要還是針對布袋蓮利用化學、物理方式進行最佳前處理再利用纖維分解菌之醱化進行最佳效能評估。

1-2 實驗設計法

在進行實驗中，許多因變數均可能影響實驗之結果，假設有 n 個因變數存在時，若為瞭解所有參數對實驗結果之影響，則必須進行 2^n 個實驗，換言之，實驗之試程將隨因素數目增加，呈倍數成長，實驗亦不易完成。部份因素設計法乃採取全因素設計的部份點來進行實驗與統計分析，若 2^n 次實驗以其操作變數之最高階對比定義關係(highest-order interaction contrast)加以分成兩組，則每組變成為一 2^{n-1} 部份因素法，此方法除可觀察主要變數對目標值的影響，亦可瞭解變數間交互作用對目標值之影響。

本年度研究將利用超音波或加酸方式進行高纖維植物之結構弱化，在酸化前處理部分，將考量樣本量(A)、反應時間(B)、溫度(C)及酸之添加濃度(D)在不同之操作範圍，配合部份因素法(fractional factorial design)之設計因素及階次，進行 8 個操作試程(2⁴-1)，再以中心組合法，進行影響單位物重醱化產量最大之二個操作因素之最佳條件，之後，以此最佳條件，再加入(自行篩選的纖維分解菌及購自中華民國菌種中心之*G.stearothermophilus* strains (ATCC 7953, ATCC 10149, ATCC 12976, and type strain DSM 22 = ATCC 12980) 進行醱化作用，並再利用部

分因素法，探討菌種數目(A)、作用時間 (B)、溫度(C)及攪拌速度(D)對單位物重醱化產量最大之二個操作因素之最佳條件，再以中心組合法，進行影響單位物重醱化產量最大之二個操作因素之最佳條件。之後，加入酵母菌*S. cerevisiae* 或 *Pichia stipitis*，前者對纖維水解成glucose 與Mannose，而後者對纖維水解成xylose 及pentose 有最佳效果，利用部分因素進行比較菌種數目(A)、作用時間(B)、溫度(C)及攪拌速度(D)進行評估各參數對酒精產量之影響，最後則探討中心組合法進行乙醇產率最佳之操作條件評估。同時亦探討酸產量對乙醇產率之影響。並使用50 g/L glucose 作發酵對照組。期間，並開發醱類物種成份、有機物性質及酵素活性之實驗參數分析方法建立。

1-3 還原糖及醱類物種之分析

本研究將採用DNS 法測定還原糖，其原理乃利用DNS 試劑中之3,5-二硝基水楊酸(3,5-dinitrosalicylic acid)與還原糖共熱反應後，產生被還原成棕紅色的氨基化合物，並於可見光波長550 nm 測得吸收值，再利用不同濃度葡萄糖製備而成之檢量線來求得菌液中之還原糖量。

關於五碳糖及六碳糖之定量，則參閱修正Nogueira *et al.*(2005)文獻之研究，將樣本以 0.45 μm 之濾膜 (Mixed cellulose ester, Advantec MFS Inc., USA) 過濾，以 HPLC(pump L-2130, HITACHI, Japan) 配合 ELSD 偵檢器 (evaporized light scattered detector, ELSD)(Model 200, SofTA, USA)進行醱類之測定，標準品為從Sigma購置之棉子糖(Raffinose)、半乳糖(Galactose)、麥芽糖(Maltose)、蔗糖(Maltose)、鼠李糖(rhamnose)、葡萄糖(Glucose)，配製不同濃度之標準品。分析管柱使用SUPELCOSIL LC-NH₂ (250 \times 4.6 mm)，移動相為經過濾後之乙腈：水=75：25，分析流速1.0 mL/min， Drift Tube (DT)：60 $^{\circ}\text{C}$ ；Spray Chamber (SC)：45 $^{\circ}\text{C}$ ，注入體積100 μL ，分析時間設定60 min，並利用peak ABC數據解析軟體，進行醱類測定。

1-4 有機物性質之分析

關於有機物分子量大小之測定，本研究參考 Her *et al.*(2004)論文，主要使用25 cm 長及內徑為 2 cm 之 TSK-50S (toyoparl HW 50S, 30 μm resin, 分離範圍小於 5×10^6 Da)，而 HPLC (LC 600 Shimadzu)配有 UV 偵檢器 (Shimadzu SPD-6A UV detector)。HPSEC 之移動相使用磷酸緩衝溶液(0.0024 M NaH₂PO₄+0.0016 M Na₂HPO₄, pH=6.8)及 0.025 M Na₂SO₄，使其離子強度控制在 0.1 M。流速控制為 1 mL/min，水樣注入體積為 2 mL。

1-5 纖維分解菌之篩選及放大培養菌數之分析

一般篩選耐高溫纖維酶菌株最常見的環境-堆肥；另一採樣環境則選擇了牛的瘤胃。目前從堆肥中篩選到三株菌株，其在活性培養基 45 $^{\circ}\text{C}$ 培養一天即可清楚觀察到明顯的澄清環，另外從牛之第四個瘤胃中篩選到一株可長於 55 $^{\circ}\text{C}$ 的細菌株，由菌落的外觀與顯微鏡的觀察判讀堆肥的菌株應是屬於桿菌屬，而牛瘤胃

所篩選到的菌株應屬於放線菌科，細菌菌種的鑑定則主要利用 16S rDNA 的方法，使用一對保留性引子使用聚合酵素連鎖反應增幅其 16S rDNA，所得 1.5 kb DNA 序列經由定序後，以 NCBI 的 BLAST 分析，堆肥中桿菌屬的菌株主要與枯草桿菌類相似度最高，而牛瘤胃所篩選到的菌株則與一些嗜熱鏈黴菌具有高達 99% 的序列相同性，可知此菌株應為鏈黴菌屬(*Streptomyces*)中的嗜熱菌。

1-6 篩選纖維分解菌之定序

菌種的鑑定主要採用 16S rDNA 的 DNA 序列分析比對。利用 16S rDNA 兩端較保留的 DNA 序列所設計的一對引子，5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (forward primer 27f)及 5'-TACGGCTTACCTTGTAGACTT-3' (reverse primer 1492r) (Lane et al.,1991)，再利用聚合酶連鎖反應(PCR)的方法將其 DNA 增幅，聚合酶連鎖反應(PCR)的反應條件如下：50 μ l 的反應液中含有 100 ng 的染色體 DNA 當做模版、0.32 μ M 的一對引子、0.2mM dNTP 及 *Taq* 聚合酵素 2.5 units，反應時的條件為第一個循環為 94 $^{\circ}$ C 3 分鐘，接著 30 個循環為 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘、48 $^{\circ}$ C 1 分鐘、72 $^{\circ}$ C 2 分鐘，最後一個循環為 72 $^{\circ}$ C 5 分鐘。

實驗中利用聚合酵素連鎖反應方法增幅出來未知菌株一段大約 1500 bp 的 16s rDNA，先利用割膠回收此片段後，將 DNA 送往源資國際生物科技股份有限公司定序其 DNA 序列。將所定序的 16S rDNA 組裝後，經由 NCBI BLAST 進行比對分析來確定菌株之屬。

1-7 有機酸類之分析

甲酸、乙酸及丙酸之測定，本研究將採用離子層析儀(Dionex, Sunnyvale, Ca, USA)，包括 GP50 之梯度幫浦(gradient pump)、EG-40 流洗液產生器、AS50 自動注射器、及 CD25 之導電度偵測器，及配合使用 IonPac AS-17 (4 \times 250 mm) 分析 (analytical)管柱及保護管柱 AG-17 (4 \times 50 mm)進行分析，儀器之控制、數據之整理及分析，則藉由電腦中之 PeakNet 6.3 層析軟體工作站進行。

1-8 氨基酸

關於胺基酸之測定，本研究以 HPLC(high performance liquid chromatograph)配合光二偶極陣列偵測器(diode array detector, DAD) 進行，流洗液與試劑混合主要參考 *Metaxatosa et al.* (2003) 之方法，而流洗條件則修正 Molnár-Perl *et al.*(2000; 2003)之方法。

2-1連續醱化及醱酵(Simultaneous Saccharification and Fermentation)程序進行生質酒精產製

取適量經前處理之樣本，置入發酵裝置，並利用 50%NaOH 調整 pH，添加之營養鹽之最終濃度為 0.5 g/L (NH₄)₂HPO₄、0.025 g/L MgSO₄·7H₂O 及適量之纖維分解酵素及控制溫度，當酵素加入起動發酵反應器，在前水解(prehydrolysis)，可於不同時間週期(16.8 及 4 hr)進行採樣分析醱類之種類及濃度且當溫度降至 35 $^{\circ}$ C，並依醱形成之種類，加入適合之酵母菌，於設定作用時間 0、2、4、8、24、28、32、48、72 及 96 hr 進行進行乙醇、糖、甘油(glycerol)、乙酸及丙酸分析，瞭解乙醇產量與其它附產物之相關性。