



大仁科技大學執行教育部98年度跨領域-綠色科技人材培育先導型計畫- 生質能源產業學程成果展示



計畫主持人：賴文亮 教授

協同主持人：邱俊彥副教授、翁順祥副教授、洪堂耀助理教授、徐淑玲副教授、李正忠副教授

課程規劃

課程規劃

圖1為生質能源產業學程之課程性質。本學程規劃核心必修課程共有4門，學生必須修讀至少其中3門，且分屬不同領域；專業選修課程5門，必須修讀其中至少4門，且分屬不同領域。必修與選修修習課程合計7門21學分以上，且必須涵蓋三大領域以上。



圖1 生質能源產業學程之課程性質



圖2 生質能源產業學程之課程地圖

成果展出

本學程之課目

學程之相關課程目前已開放能源與環境、綠色能源產業概論、生物技術、有機化學、厭氧生物技術、綠色資源產品開發暨實作，以上課程資料可至網址 <http://www.tajen.edu.tw/~envmange/ip2009/> 進行查詢。

| 科系 | 課程名稱(簡報檔) | 已/未開課 |
|---------|-----------------|-------|
| 環資系 | 能源與環境 (11) | 已開 |
| 環資系 | 綠色能源產業概論 (6) | 已開 |
| 環資系 生科系 | 生物技術 (6) | 已開 |
| 環資系 生科系 | 有機化學 (8) | 已開 |
| 生科系 | 醱酵技術 (6) | 未開 |
| 環資系 | 厭氧生物技術 (1) | 已開 |
| 環資系 | 生質能轉化技術 (9) | 未開 |
| 食品系 | 生物資源利用 (11) | 未開 |
| 環資系 | 綠色資源產品開發暨實作 (2) | 已開 |

圖3 生質能源產業學程各課程在各系開課情形

研討會論文及綠色科技創新創意競賽

邱俊彥、陳振正、仲崇毅、廖少威、陳上權、賴文亮*，以實驗設計法 探討布袋蓮醱化之最佳操作條件。第十三屆海峽兩岸環境保護學術研討會(2009,8月,摘要已寄出)

計畫主持人賴文亮教授指導之學生研究團隊參加「跨領域-綠色科技人才培育先導型計畫-2009綠色科技創新創意競賽」，以「布袋蓮轉化之生質酒精」之作品參賽，研究係利用人工濕地中快速繁殖的水生植物布袋蓮為產製原料，藉此不僅可解決人工濕地內植物生長快速且過密導致之優養化現象及蚊蚋滋生之問題，並達到廢棄物資源化再利用之經濟目的。作品於初賽獲得入選並取得進入決賽資格。相關之研究設備及成果見圖4。

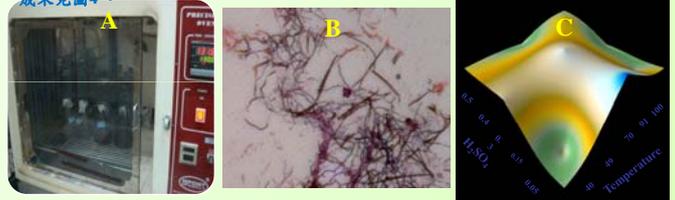


圖4 布袋蓮轉化之生質酒精之相關設備及成果(A) 醱解布袋蓮之烘箱；(B) 顯微鏡下觀察的放線菌科型態(纖維分解菌)；(C) 不同硫酸濃度及溫度對每克布袋蓮產生 mg 還原糖量(反應時間=70min,粒徑=0.149 mm)

建置多媒體教學平台

本計畫建置生質能源教育成果展示網站內容為生質能源產業學程計畫98年2月推展至今，其功能為學校與社區環境教育資訊平台之建構及推展，相信藉此資訊平台之建構將能提升學生與社區民眾對生質能源科技之興趣與認知。



圖5 本校執行教育部98年度跨領域綠色科技人材培育-生質產業學程之網頁首頁 (<http://www.tajen.edu.tw/~envmange/ip2009/>)

舉辦相關教學研討會

本計畫於97學年度第二學期，98年4月30日舉辦「能源教育」研討會，邀請產官學界專家共同討論能源議題，演講題目包括生態化設計之應用與趨勢、生質燃料回顧及其發展、蝴蝶效應 綠色節能及台電公司電力政策及友善環境規劃。除可開拓提供同學新視野外，學校老師亦可從不同領域思考此新議題。



檢討與修正

在教學方面，本計畫將強化課程檢討機制、教材製作、教學實施與評量，以提昇本學程的教學品質。

在實作方面，本計畫將整合本院三個科系的相關硬體設備與資源，強化相關課程的教學實驗設備，以提昇本校在綠色科技領域的研究質量，並將本計畫的研究成果透過成果發表會與研討會、期刊研究論文發表，增加產學合作之機會。

為使計畫資源發揮最大效益，達到資源共享之目的，如何吸引本學院更多學生參與修課，應是本計畫之重點。

下半年度規劃

持續建置「生質能源產業學程」教育成果展示網站內容，呈現更多之相關研究訊息及本學程之最新成果，並加強與國內相關網站之連結。

利用本校網路及電子報，加強本學程之宣導工作。

利用教學過程，學校輔助教學系統，瞭解學生之吸收效果，藉以強化及修正課程內容。

有效運用有限經費，加強綠色資源產品開發暨實作成果。

舉辦產學期末座談研討會及學程實作成果展。



布袋蓮轉化生質酒精



隊名：綠意盎然

摘要

由於水生植物之纖維素結構緊密穩定，不易為纖維分解菌利用，故為使纖維分解菌發揮功能，本研究採酸化方式進行布袋蓮之纖維素結構弱化，並利用部分因素法(Fractional Factorial Experiment Design)，進行風乾後之布袋蓮在(A)布袋蓮粉末粒徑大小、(B)反應時間、(C)溫度及(D)酸之添加濃度等參數下，各對應值分別為(1.68 mm, 0.149 mm)、(30 min, 120 min)、(40°C or 100°C)及(0.05 M, 0.5M)，進行不同之操作試程，並利用還原糖量測定方法，進行樣本中醱化產量(mg glucose/g布袋蓮)之計算，結果顯示，影響每克布袋蓮產生葡萄糖(mg)之參數，主要為硫酸濃度及水浴溫度，兩者皆屬正效應，亦即硫酸濃度越高、溫度愈高，每克布袋蓮產生之葡萄糖量愈高。最後，固定布袋蓮粉末粒徑(0.149 mm)及加熱時間(120 min)，當硫酸濃度控制在0.05M-0.5M，溫度條件在40°C-100°C，進行中心組合法(Central Composite Design)，發現每克布袋蓮產生葡萄糖(mg)之最佳條件在硫酸濃度為0.05M，溫度則是70°C。

關鍵詞：部分因素法

壹、前言

研究背景

人工濕地內植物(如布袋蓮)生長快速且過密，除使濕地系統無法發揮防洪及淨化水質功能外，還會導致蚊蚋滋生，故利用濕地內生長快速且過密的大型水生植物進行生質能產製，不僅可達到廢棄物資源化再利用之目的，亦可維持濕地內的生態平衡及生態景觀功能。



研究目的

探討以酸化方式進行布袋蓮之纖維素結構弱化，並利用部分因素法及中心組合法探討葡萄糖產量之最佳條件

利用纖維分解菌進行醱化作用並利用部分因素法及中心組合法進行影響單位物重醱化產量最大之操作因素之最佳條件

加入產醇菌，*Zymomonas mobilis*，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醱產率最佳之操作條件評估

貳、研究方法與結果

纖維分解菌之篩選及鑑定

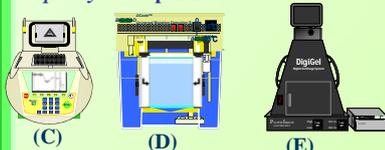
篩選

本實驗從高雄屠宰場牛胃檢樣品中，篩選到一株具有具有纖維水解酵素活性的菌株，代號為C27。下圖(A)C27培養於營養瓊脂培养基時的菌落型態(B)C27菌株於55°C培養在含CMC的活性培养基中，經由剛果紅染色後於菌落周圍出現明顯的澄清環(C)在顯微鏡的觀察下是典型的放線菌科型態。外觀為桿狀的革蘭氏陽性細菌個體如真菌菌絲纏繞在一起，液態培養時則如毛茸茸的菌絲球。

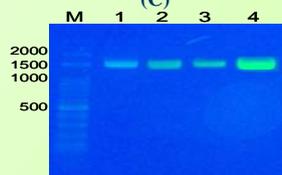


鑑定

利用16S rDNA的方法來鑑定所篩選到的菌株，使用聚合酶連鎖反應(PCR)方法來增幅可得到一段大約 1.5 kb的產物(右上圖A)，割膠回收此DNA片段，此DNA片段經由生技公司定序之後將序列拼接組裝後，利用NCBI的BLAST比對分析。C27的比對結果如右下圖(圖B)，此菌株與Streptomyces這一屬菌株有高達98-99%的相同性，其中與嗜熱性鏈黴菌的相同性最高，目前暫時命名為Streptomyces sp. PTC27。



(C) PCR (Bio-Red MyCycle, Bio-Red, USA)
(D) DCode (The DCode™ Universal Mutation Detection System, Bio-Red USA)
(E) Digi Gel Digital Gel Image System



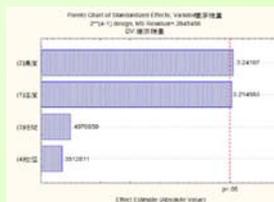
圖A：C27菌株16S rDNA的PCR產物電泳圖。M：100 bp ladder 標準品、欄1：C27的16S rDNA PCR產物、欄4。



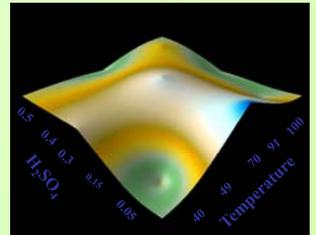
圖B：C27之16S rDNA於NCBI網站以BLAST比對分析所得的結果

纖維結構弱化

利用部分因素法將風乾後之布袋蓮在(A)布袋蓮粉末粒徑大小、(B)反應時間、(C)溫度及(D)酸之添加濃度在不同參數下進行不同之操作試程，並利用還原糖量測定方法，進行樣本中醱化產量(mg glucose/g布袋蓮)之計算，結果顯示，影響每克布袋蓮產生mg glucose之參數，主要為硫酸濃度及水浴溫度，兩者皆屬正效應，亦即硫酸濃度越高、溫度愈高，每克布袋蓮產生之葡萄糖量愈高(圖A)。之後，固定布袋蓮粉末粒徑，硫酸濃度控制及溫度條件下進行中心組合法，發現每克布袋蓮產生mg glucose之最佳條件為，硫酸濃度為0.05M，溫度為70°C(圖B)。



圖A 以部分因素法進行硫酸濃度、溫度反應時間及布袋蓮粒徑大小對每克布袋蓮產生mg還原糖產量之影響效應值



圖B 不同硫酸濃度及溫度對每克布袋蓮產生mg還原糖量(反應時間=70min,粒徑=0.149 mm)

Zymomonas mobilis的篩選及培養基成分

Z. mobilis 為兼性厭氧、革蘭氏陰性的酒精生產菌，由釀酒桶內所分離篩選，生長最適溫度在30°C，致死溫度在55~60°C，耐酒精濃度在2~10%，生長pH值在從3.5~7.5之間

| Component | Content (g/L) | Component | Content (g/L) |
|---|---------------|---------------------------------------|---------------|
| Peptone | 1.0 | CaCl ₂ | 0.34 |
| Glucose | 10.0 | FeSO ₄ · 7H ₂ O | 0.005 |
| KH ₂ PO ₄ | 2.0 | ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0.0014 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.4 | MnSO ₄ · H ₂ O | 0.0016 |
| Urea | 0.3 | CoCl ₂ · H ₂ O | 0.004 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.3 | pH | 7.0 ± 0.1 |



Zymomonas mobilis培養基組成成分

Zymomonas mobilis於營養瓊脂培养基時的菌落型態

參、結論及建議

結論

本研究從堆肥中篩選到三株菌株，其在活性培养基45°C培養一天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°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，經定序及鑑定後發現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性鏈黴菌具有高達99%的序列相同性，可知此菌株應為鏈黴菌屬(*Streptomyces*)中的嗜熱菌。

✓影響每克布袋蓮產生葡萄糖(mg)之參數，主要為硫酸濃度及水浴溫度，兩者皆屬正效應。固定布袋蓮粉末粒徑及加熱時間，當硫酸濃度控制在0.05M-0.5M，溫度條件在40°C-100°C，進行中心組合法(Central Composite Design)，發現每克布袋蓮產生葡萄糖(mg)之最佳條件在硫酸濃度為0.05M，溫度則是70°C。

建議

目前實驗只進行至布袋蓮之纖維結構弱化之最佳條件，在未來則會進行產醇菌*Zymomonas mobilis*，或酵母菌*S. cerevisiae*進行纖維水解成glucose與Mannose之產醇實驗，並利用部分因素進行比較(A)菌種數目(B)作用時間(C)溫度(D)及攪拌速度)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。



煙氣中二氧化碳濃度對螺旋藻中色素及胺基酸成份之影響

李崇垓¹ 仲崇毅¹ 陳上權² 何曉蓉³ 李彥緯³ 賴文亮^{4*}

1. 副教授, 大仁科技大學環境資源管理系
2. 碩士班研究生, 大仁科技大學環境資源管理系
3. 大學部學生, 大仁科技大學環境資源管理系
4. 教授, 大仁科技大學環境資源管理系

摘要

本研究以台灣南部某一燃煤火力發電廠之煙道氣, 控制CO₂濃度為0.035%(對照組)、3%及6%(v/v), 通入培養極大螺旋藻(*Spirulina maxima*)之戶外開放式水道(水流速度為30 cm sec⁻¹), 探討CO₂濃度對螺旋藻不同生長階段之藻體及釋出物之螢光激發發射光譜(Excitation Emission Fluorescent Matrix, EEFM)之差異外, 另比較藻體中色素與胺基酸組成份之差異。依目前數據結果顯示, *S. maxima*在三種CO₂濃度之培養過程中, 藻體在發射波長小於400 nm及640 nm均會出現明顯波峰, 此物質分別與藻體中似蛋白質及色素成份相關; 另藻體之釋出液中, 發射波長小於400 nm及440 nm亦會出現明顯波峰, 此兩種波峰之形成物質, 推測藻體之釋出液中含似蛋白質及似腐植質之有機物。激發波長在370 nm, 發射波長在450 nm與500 nm之螢光強度比值(E450/E500)則約在2左右。各試程培養過程中, 藻水中非揮發性溶解性有機碳(Non-Purgeable Dissolved Organic Carbon, NPDOC)均呈現增加, 且水相中有機物以25 kDa以下之低分子量為主。另*S. maxima*藻體中還原糖含量, 通入3%及6%之CO₂者較僅空氣培養(0.035% CO₂)為低。在對數期, 藻體乾重所含色素量, β-Carotene及Chlorophyll *a*之值, 隨煙氣含CO₂量之增加而增加, 但Fucoxanthin及Lutein/Zeaxanthin則煙氣含CO₂量之增加而減少。在穩定期, 色素含量隨CO₂量之增加而減少者為Fucoxanthin, 隨CO₂量之增加而增加者為Chlorophyll *a*, 胺基酸成份, 以Arginine及Glutamine及Aspartic acid為主, 三者佔總胺基酸之含量百分比約40%。

關鍵詞: 螺旋藻; 色素; 胺基酸; 似蛋白質; 似腐植質; 螢光激發發射光譜圖

壹、前言

一、研究背景

以燃燒化石燃料作為能源過程, 產生大量之二氧化碳, 且大氣中CO₂濃度之增加是導致近幾十年全球暖化現象之主要原因, 其濃度值從工業化前的280 ppm增加到2005年的379 ppm, 且近十年中(1995-2005年平均)增長速率1.9 ppm/年, 較1960-2005年平均之1.4 ppm/年 更高。而化石燃料之使用, 隨經濟成長與電力需求增加, 電力業成為CO₂最高排放固定源, 且以國內之電力生產體系, 主要以火力發電為主, 其中, 又以燃煤產生之CO₂最高, 故針對燃煤火力發電廠煙道氣中CO₂進行減量是有必要的。

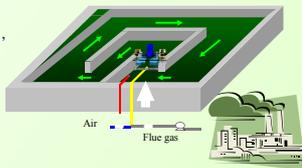
二、研究目的

- 燃煤火力發電廠之煙道氣, 通入培養極大螺旋藻(*Spirulina maxima*)之戶外開放式水道, 利用EEFM進行CO₂濃度對*S. maxima* 在不同生長階段之藻體及釋出物有機物性質比較。
- 藻體釋出有機物分子量大小分佈, 及藻體色素及胺基酸組成份及含量之差異。

貳、研究方法

□ 開放式水道規格

本研究使用之開放式水道面積為74.34 m², 高為0.53 m, 每一水道之寬度為2.16 m, 試驗之培養水深設定為0.15 m, 每一試程蓄水量約為11噸, 即1噸之預先培養之藻水與10噸營養鹽(不包括碳源)進行混合。通入煙道氣不同CO₂濃度, 藉由藻池內之輪槳式(paddle wheel)水車, 產生混合及循環水流, 水流速度設定為30 cm sec⁻¹, 使CO₂得以充分混合, 而CO₂濃度之控制, 採煙道氣與空氣比例混合稀釋方式進行控制。



□ 操作試程

Blank(對照組) (0.035%CO₂): 97年3月25日至97年5月5日。3% CO₂ 97年1月26日至97年2月19日。CO₂ 6%) 97年6月23日至97年7月8日。

試驗期間, 煙道氣中之CO₂供應, 在配合電廠之實際操作下, 進氣時間為上午9:00至下午16:00, 每日煙道氣進氣約7小時, 並於上午開啟煙道氣前及採樣前進行各項參數監測, 監測項目含藻水溫度、光照強度及pH值, 並於下午15:00採樣, 及測定藻體乾重及UV680, 作為藻體成長階段之判斷方式。

□ 分析參數

一、螢光激發發射光譜

以螢光光譜儀(F-4500, Hitachi, Japan)進行藻類或其釋出有機物之螢光分析, 該設備光源採用氙燈作為光源, 功率為150 W, 激發發射掃描範圍200-800 nm, 光柵設定為10 nm。

二、水相中非揮發性溶解性有機碳及分子量大小測定

相中非揮發性溶解性有機碳(Non-Purgeable Dissolved Organic Carbon, NPDOC)之分析, 以總有機碳分析儀(Multi N/C 3000, Analytik Jena AG, Germany)進行NPDOC含量之測定。

有機物之分子量(Molecular weight)以高效液相層析(HPLC) (pump L-2130, HITACHI, Japan)配合ELSD偵檢器(Evaporized Light Scattered Detector)(Model 200, SofTA, USA)進行。

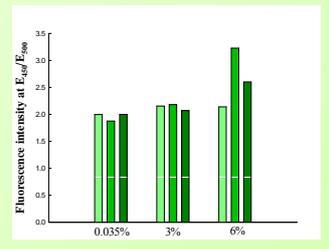
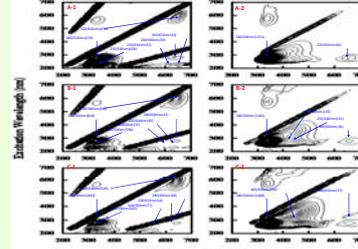
三、藻體內之醣類、色素、胺基酸及碳量之測定

藻粉中之總醣以DNS法進行測定。色素之測定, 以HPLC進行測定, 操作條件則參考之研究, 分析管柱為Agilent HC-C18 (5 μm, 250x4.6 mm, Agilent Technologies, US), 偵測器為UV detector (L-4200, Hitachi, Japan), 波長設定為431 nm。

胺基酸測定, 以HPLC配合光二偶極陣列偵測器(Diode Array Detector, DAD)進行測定, 其管柱為Agilent HC-C18(4 μm, 250x4.6 mm, Agilent Technologies, U.S.), 設定波長為334 nm, 藻體含碳量則以元素分析儀(Vario-EL III, Elementar, Germany)進行測定。

參、結果與討論

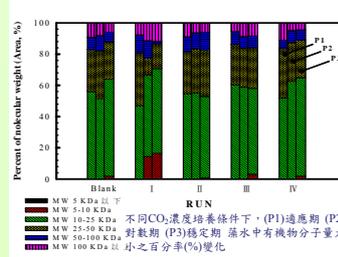
□ *S. maxima* 藻水及過濾液中之EEFM圖



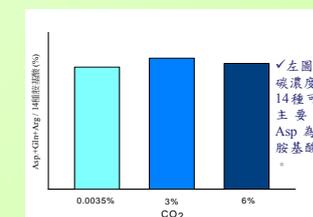
左圖為*S. maxima*於6% CO₂濃度培養條件下, (A)適應期 (B)對數期 (C)穩定期之螢光激發發射光譜圖(1: 藻液; 2: 藻水之過濾液) 右圖為各試程藻水之過濾液發射光E₄₅₀/E₅₀₀之螢光強度比值變化 (Blank) 0.035% CO₂, 15 cm s⁻¹; (II) 6% CO₂, 30 cm s⁻¹; (IV) 3% CO₂, 30 cm s⁻¹試程0.035% CO₂, 30 cm s⁻¹

- ✓ 藻體在各試程之適應期、對數期及穩定期, 發現除EX: 230/EM: 320-340 nm及EX: 280/EM: 320-330 nm出現波峰之位置屬似胺基酸物質, 另EX: 620-630/EM: 630-640 nm之位置, 屬色素成份。
- ✓ 藻水之過濾液部份, 除出現似胺基酸之波峰位置外, 部分試程在EX: 320-370/EM: 390-440 nm之位置亦出現似腐植質之波峰
- ✓ 各試程藻水之過濾液於發射波長E₄₅₀/E₅₀₀強度比值普遍於1.9以上。

□ 釋出有機物之分子量大小分佈



✓ 左圖顯示25 kDa以下之低分子量為主, 其次為25 KDa-50 KDa, 在3% CO₂之煙道氣培養之*S. maxima*藻體釋出有機物量, 在對數期及穩定期25 kDa以下之低分子量則高達70%。



□ 不同CO₂濃度對糖類、色素及胺基酸組成份含量之影響

✓ 左圖顯示三種二氧化碳濃度培養*S. platensis*, 14種可分析之胺基酸, 主要以 Arg. 及 Glu. 及 Asp 為多, 三者佔14種胺基酸組成份之34.5%。

✓ 左圖顯示每克單位乾重藻體含總糖量(mg), 僅空氣培養者高於3%及6%CO₂培養試程, 三試程之糖類含量之差異, 與CO₂含量及pH之差異相關。

| 色素組成份 | 0.035% CO ₂ | | 3% CO ₂ | | 6% CO ₂ | |
|-------------------|------------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|
| | 對數期 | 穩定期 | 對數期 | 穩定期 | 對數期 | 穩定期 |
| Chlorophyll c2 | 0.140 | 0.509 | ND | 0.311 | ND | ND |
| Fucoxanthin | 0.476 | 1.098 | 0.279 | 0.342 | 0.091 | 0.198 |
| Lutein/Zeaxanthin | 0.777 | 0.869 | 0.524 | 0.633 | 0.501 | 0.665 |
| Chlorophyll b | ND | 0.598 | ND | 0.608 | 0.307 | 0.209 |
| Chlorophyll a | 0.614 | 1.008 | 0.902 | 1.063 | 1.098 | 1.467 |
| β-Carotene | 0.614 | 2.465 | 1.396 | 1.765 | 1.639 | 2.026 |

三種CO₂濃度下, 單位乾重*S. maxima*藻體在對數期及穩定期階段之色素含量(mg g⁻¹)

肆、結論

- (1) *S. maxima*藻體在發射波長小於400 nm及640 nm會出現明顯波峰, 分屬似蛋白質及色素成份, 色素主要以β-Carotene及Chlorophyll *a*為主。藻體釋出液中, 發射波長小於400 nm及440 nm, 則與藻體之釋出液中含似蛋白質及似腐植質之有機物。水相有機物之E₄₅₀/E₅₀₀值約在2左右, 以小於25 kDa之低分子量為主。
- (2) 在對數期, 藻體乾重所含色素量, β-Carotene及Chlorophyll *a*之值, 隨煙氣含CO₂量之增加而增加, 但Fucoxanthin及Lutein/Zeaxanthin則煙氣含CO₂量之增加而減少。在穩定期, 色素含量隨CO₂量之增加而增加者為Fucoxanthin, 隨CO₂量之增加而減少者為Chlorophyll *a*。
- (3) 胺基酸組成份之含量以Arginine為最高, 其次為Glutamine及Aspartic acid, 三者含量佔總胺基酸含量約40%; 含量最低者為Methionine。