

中華民國 第 49 屆中小學科學展覽會  
作品說明書

---

高中組 化學科

第三名

040207

綠能新希望!——纖維酒精有效製程之研究

學校名稱：國立高雄師範大學附屬高級中學

作者： 高二 鄭丞舜 高二 陳子雄	指導老師： 呂美芳
-------------------------	--------------

關鍵詞：纖維素、纖維素分解菌、T4 菌株

## 中文摘要

嗜高溫好氧菌 *Geobacillus thermoleovorans* T4，是被報導具纖維素分解能力的菌株，但僅止於學術研究階段。本研究成功地應用於廢棄纖維素的轉化，並獲得二重要結果：第一，T4菌株可將稻桿與稻穀殼分解為還原糖；調整培養基氮碳比、纖維預先蒸煮及以臭氧斷鏈皆可有效提升還原糖產率；纖維素轉化為還原糖最佳化條件為稻穀殼先高溫蒸煮爆碎，在氮碳比為1：7的培養基中，pH=6、65°C時，還原糖產率可高達69.81%。第二，未以臭氧，將T4菌株反應後之稻穀殼溶液，植入30mL、有高的酒精耐受度(30%以上)的 *Saccharomyces diastaticus* 菌株反應72 hrs後，酒精發酵率高達79.89%。換言之，目前本研究纖維酒精產率至少可達28%以上，而且製程中產能與耗能確可達到綠色能源訴求。圖1.為自製生質酒精反應器，初步已有24%的轉化效果。



圖1. 農業廢棄纖維素轉化為生質酒精之自製反應器

## 壹、緒論

基礎化學第二章「自然界中的物質」，提到了許多現在世界上嚴重的環境破壞，例如：空氣污染、水污染等，老師也提到了許多有關垃圾污染的問題。在課本中寫到，解決這些污染有四種辦法：減量(reduction)、重複使用(reuse)、回收(recycling)及再製(regeneration)，這4R讓我們聯想到，如果將一些可利用資源，回收並使其改變為其他可利用的能源，那不僅可以解決垃圾問題，也能解決能源問題，一舉兩得！

台灣每年約有 600 萬噸的纖維性廢棄物由稻米、糖廠與蔬果加工所生產，而根據我們查到的文獻資料，目前生質酒精之生產主要以甘蔗及玉米為原料，稱為第一代生質酒精，但因有「與糧爭地、與人爭糧」之疑慮，因此，各國致力開發以自然界產量豐富之木質纖維為原料生產酒精，亦稱為第二代生質酒精，其生產原料包含：稻稈、玉米稈、小麥稈、蔗渣、木屑、廢木材等農林業殘留物及其他草本植物，亦稱纖維酒精。

反觀我國，目前除了經濟部能源局、中研院外，行政院原子能委員會也都投入開發生質能源的行列，但纖維素轉化的技術仍無量產經驗(表一)。科學月刊 2009 年報導中即以稻稈、蔗渣、芒草等纖維原料，研發纖維轉化酒精技術。根據中研院提供的資料，目前待突破技術有(1).纖維素分解酵素、(2).針對國內有潛能纖維素料源之分解酵素、(3).低成本量產纖維素分解酵素、(4).製程整合與簡化關鍵技術、(5).基因重組發酵菌株、(6).同步發酵五碳糖與六碳糖菌株、(7).結合纖維素水解與五、六碳糖發酵菌株。

表一 國內生質酒精技術現況

技術名稱	料源開發	量產技術	總成本(元/升)	綜合評價
糖質轉化	甘蔗與甜高粱種植、採收技術	台糖	27.4 <sup>#</sup>	■ 生產成本過高 ■ 國內尚有離蔗政策
澱粉轉化	甘藷種植、機械採收政策	酒廠	20.5 <sup>*</sup>	■ 國內有良好之種植經驗 ■ 農試所已進行量產研究
纖維素轉化	農業廢棄物、纖維作物種植	無量產經驗	—	■ 國內正開始技術研發 ■ 未來最有競爭性

資料來源：\* 能源計畫辦公室(2006) ”台灣生質酒精發展策略之芻議”，含休耕補助45000元/公頃。# 台糖公司, 2006/09/07

## 貳、動機與願景

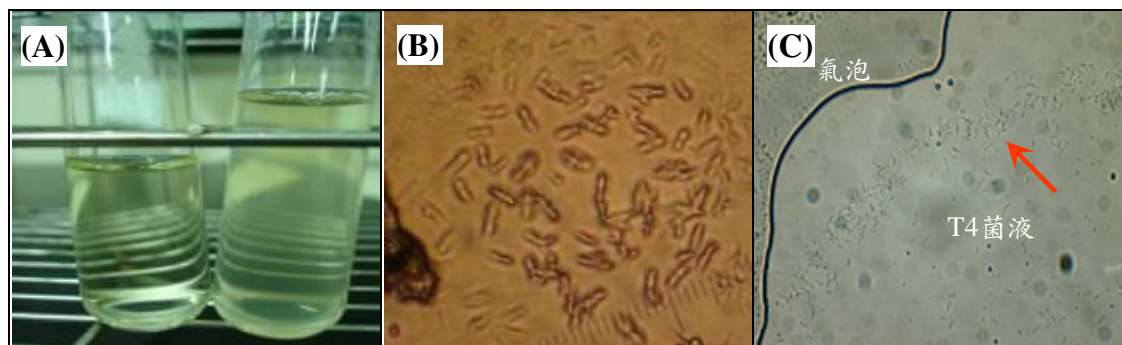
國中時我曾經做過利用酵母菌將葡萄糖發酵成酒精的實驗，有了這樣的經驗，加上在基礎化學第五章，我們知道這些物質都是由單醣聚合而成的纖維素，屬於多醣類，而在基礎生物第二章「生物多樣性」中提到，細菌於自然界中，有些可擔任分解者的角色，能分解複雜的有機物，而真菌界中的酵母菌可行發酵作用，利用葡萄糖產生酒精。我們想：如果可以用微生物將多醣分解為單醣，再發酵為酒精，不僅減少農業廢棄物的浪費，更可開發出生質能源，相信會給社會帶來更多的幫助。為了達到這個目的，於是我們做了這個研究，希望能為現今的環境貢獻一己之力。

由文獻上知道，在利用纖維素分解酶把纖維素水解為葡萄糖時，除有木質素和半纖維素的纏繞阻撓之外，由於纖維素本身晶體結構的問題，使得酵素不容易接近它的表面，造成分解效率緩慢。因此須透過前處理步驟去除木質素並溶解半纖維素，提高纖維素和酵素的接觸面積，加快分解速率。前處理的方法大致可分為物理法、物理化學法、化學法、生物法等，其中生物處理法是發展的方向。因此我們開始找尋可以分解農業廢棄纖維素的菌株，企盼不僅能解決農業廢棄纖維素浪費的問題，還能有效產出綠色替代能源。

### (一) 尋找纖維素分解菌及菌的活化與純化

我們在中山大學生物科學研究所戴上凱的博士論文「熱穩定性纖維素分解細菌分離株之特性探討與親緣關係的研究」中，得知 *Geobacillus thermoleovorans* T4 (以下簡稱為 T4) 菌株可以分解所羧甲基纖維素(CMC)，因此我們自 BCRC 買來的 T4 菌種放入 NB 培養液中進行活化，經過 16 小時，將菌液取出，重複上述動作三次後，即完成活化，開始進行純化。

另外一方面，可同時進行保存菌體的動作，由 NB 中取出部分菌液放入離心管，放入  $-85^{\circ}\text{C}$  冰庫中保存即完成。



活化後的 T4 菌 顯微鏡下的 T4 菌(1000x) T4 菌向氣泡處聚集  
(右為一次活化，左為二次活化)

圖 2. T4 菌株的活化、純化與特性

## (二) T4菌株是否能分解農業廢棄纖維素試驗

我們以CMC作為對照組，在培養基配方中將CMC依次換作已清洗、烘乾、磨成粉的玉米秸粉末、稻桿粉末及稻穀殼粉末，再依一定時間測其菌數及還原糖產量，得結果如下：

### 1. 還原糖濃度相對於吸光值之標準曲線製作

稀釋不同濃度的葡萄糖溶液 (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 mM)，加入等體積之DNS後測量吸光值 (OD<sub>550</sub>)，最後得一趨勢線，即為還原糖濃度相對於吸光值之標準曲線。在之後的實驗中，得到樣本的DNS吸光值之後，帶入標準曲線中即為該樣本中還原糖的濃度。

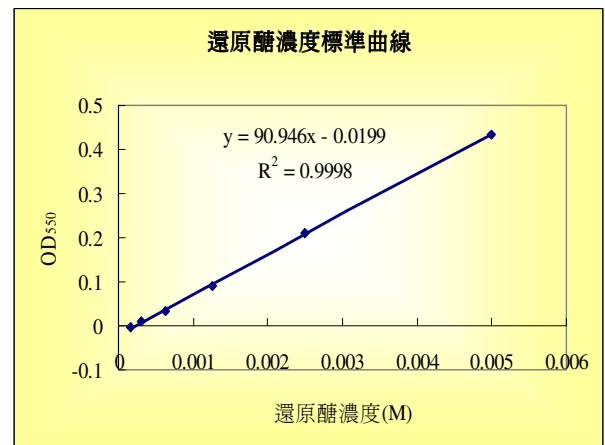


圖 3. 葡萄糖濃度相對吸光值之標準曲線

### 2. T4菌於不同培養基之菌數生長與還原糖產量比較

由圖 4.結果發現在 60°C 的培養下，T4 菌皆可在 CMC、稻桿與稻穀殼這三種培養基中生長繁殖；在 CMC 培養基中作用約 6 個小時數量達到高峰，並且至少維持 4 個小時；在稻桿培養基中生長的情形最差，在培養後 8 小時數量達到高峰；在稻穀殼培養基中生長的效果最好，也在培養後 8 小時數量達到最高峰；玉米秸則因效果不佳而作廢。

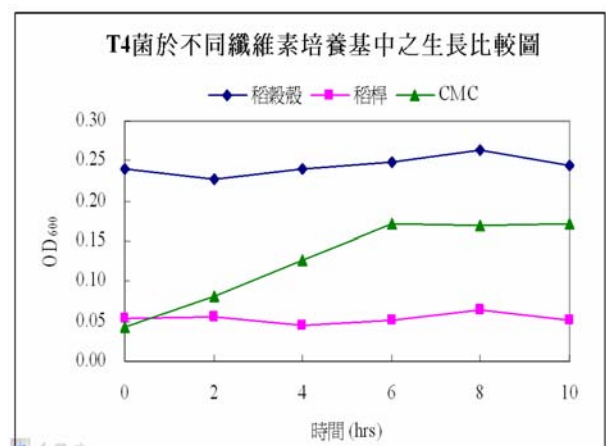


圖 4. T4 菌於不同培養基中之生長比較圖

經由測量還原糖的結果，我們將有菌與無菌培養基的還原糖濃度相減以代表還原糖產量，由圖 5.結果發現，T4 菌與 CMC、稻桿培養基作用約 4 個小時達到最大還原糖產量；而稻穀殼培養基在作用約 2 小時即有最大還原糖產量，表示在 60°C 的培養下，T4 菌皆可在這三種培養基中發揮其分解纖維素為還原糖的能力，尤其在稻穀殼培養基中還原糖的產量最大也最快，在 2 小時後即有 21.50% 的產率(圖 6.)。

此外，比較圖 4.與圖 5.的結果，可發現當在不同培養基中，當細菌數量逐漸增加時，還原糖產量卻有下降的趨勢，推測 T4 菌大量繁殖後，可能會因為養分的不足而大量利用其分解所得的還原糖作為養分的來源，導致還原糖濃度下降。



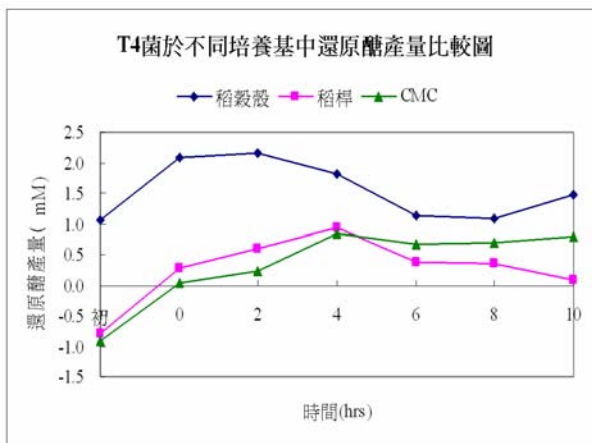


圖 5. T4 菌於不同培養基中還原醣產量比較圖

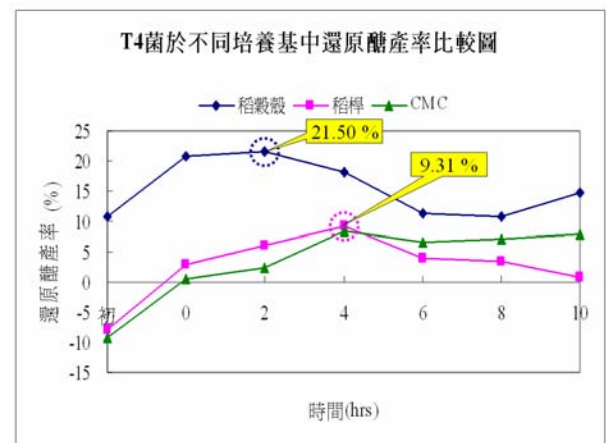


圖 6. 各種培養基 1 克纖維素所產生的還原醣量產率比較圖

### (三) 酒精發酵菌株的選擇、活化、保存及酒精耐受度試驗

#### 1. *Saccharomyces diastaticus* 菌種的活化及保存

將自 BCRC 買來的 *Saccharomyces diastaticus* 菌種放入冷凍保存培養基培養液中進行活化，經過 24 小時，將菌液取出，重複三次後完成活化。圖 7. 為活化後之酵母菌出芽生殖時之顯微照片。之後取活化後菌液 2ml，加入 80% 甘油 2ml，混合均勻後置入  $-80^{\circ}\text{C}$  的冷藏櫃保存。



圖 7. 多極出芽生殖的酵母菌 (1000X)

#### 2. 菌數測量

取活化過之菌液 1ml 至 100ml 培養基，每個一小時取 1 mL 的菌液，用滅菌過的水將菌液稀釋到適當的濃度，再利用血球計數器放入光學顯微鏡中的方式來推算酵母菌每 1 小時的總菌數目，連續測 12 小時。由圖 8. 結果發現，因培養基中含有酵母萃取物，使我們在血球計數器上有辨識的困難。

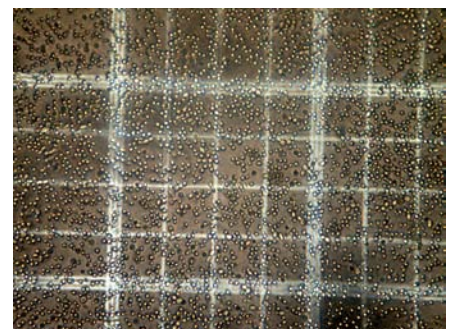


圖 8. 血球計數器下的酵母菌 (400X)

#### 3. *Saccharomyces diastaticus* 菌株酒精耐受度試驗

由於我們企盼本研究所得之纖維酒精含量要愈高愈好，而**一般酵母菌通常無法存活於高濃度的酒精中**，因此我們必須確認此酵母菌株的酒精耐受度，所以設計以下實驗。

取活化過之酵母菌液 1ml，分別加入體積百分比依次為 10%、20%、30% 的酒精調成總體積為 100ml 的培養液，經過 24 小時的培養，再以顯微鏡觀察其生長情況；結果如圖 9. 所示(紅圈處表酵母菌行出芽生殖)。由圖 9. 明顯可知，*S. diastaticus* 菌株的酒精耐受度，隨酒精濃度增加菌數有減少趨勢，但在 30% 的酒精培養液中仍有不錯的生長，甚至還有出芽生殖在進行。

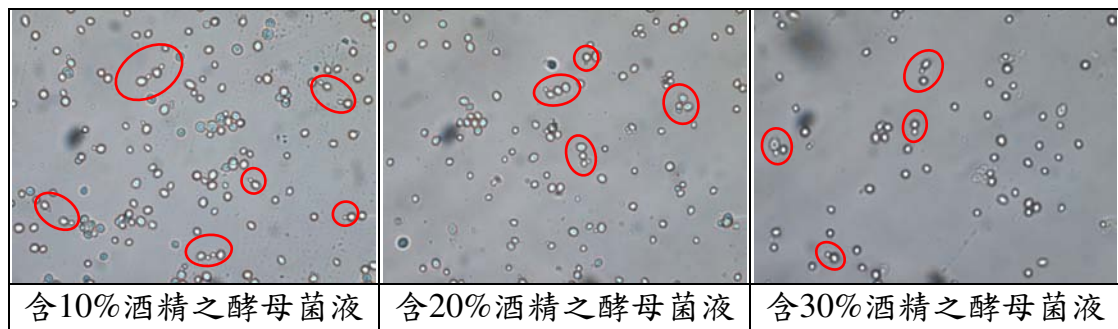


圖 9. 酵母菌在不同濃度酒精培養液中生長情形比較

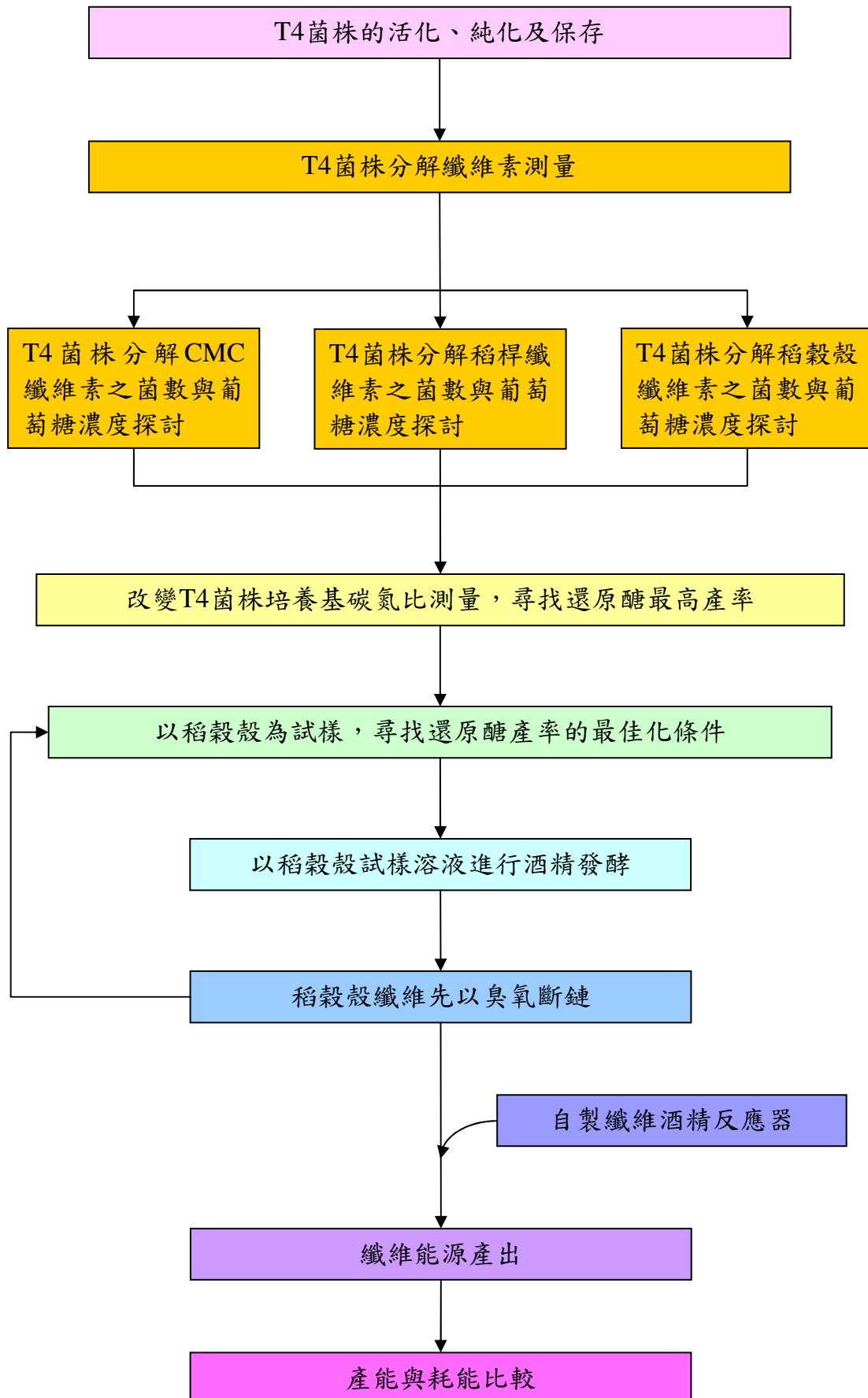
### 參、研究方向與架構

本研究主要想了解 *Geobacillus thermoleovorans* T4 (以下簡稱為 T4) 菌株，在以羧甲基纖維素(carboxymethyl cellulose, CMC) 作為對照組下，是否能有效地分解廢棄纖維素成為葡萄糖。再利用 *Saccharomyces diastaticus* 菌株進行酒精發酵，以發酵培養基作為對照實驗，以檢測 *S. diastaticus* 是否能有效地分解試樣溶液為酒精，並設計一纖維酒精高產率的製作流程。

根據上述目的，本研究分成七部分進行並探討下列問題：

- 第一部份：調整不同培養基中氮碳比對還原糖產率的影響。
- 第二部份：將纖維素預做蒸煮對還原糖產率的影響。
- 第三部份：針對轉化最佳種類找出纖維素分解為還原糖之最佳化條件，作為下一階段：「轉換為纖維酒精」之準備。
- 第四部份：探討酵母菌在最佳條件下，酒精發酵時間與酒精產率及菌數濃度變化關係，求出 *S. diastaticus* 菌株對稻穀殼試樣溶液酒精發酵率。
- 第五部份：探討纖維先以臭氧斷鏈處理對還原糖產率是否有提升。
- 第六部份：自製纖維酒精反應器，將此生產技術更便利化與生活化。
- 第七部份：纖維酒精製程中，耗能與產能之比較。

## 肆、研究流程





## 伍、材料與方法

### 一、菌種來源：

1. *Geobacillus thermoleovorans* T4-17200 菌株：購自新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(BCRC)，為嗜高溫好氧纖維素分解菌。
2. *Saccharomyces diastaticus*-21662 菌株：購自新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(BCRC)，為進行酒精發酵之酵母菌。

### 二、培養基：

1. Modified chemically defined CMC medium (Mandels and Reese, 1957)

其主要的配方如下表二所示，其中含有羧甲基纖維素(CMC)，可當作主要碳源，除了可做菌種保存的液體培養基外，並可誘發纖維素分解酵素的產生。

表二 Modified chemically defined CMC medium

Component	Content (per liter)
Peptone	1.0 g
CMC	10 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.4 g
Urea	0.3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g
CaCl <sub>2</sub>	0.34 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.3 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5.0 mg
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1.6 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.4 mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.0 mg
pH	7.0

(Mandels and Reese, 1957)

2. 稻稈、玉米秸、稻穀殼培養基

分別將取得的稻稈、玉米秸及稻穀殼，以80°C烘乾10小時之後，利用均質機打碎至粉末狀，以10 g的粉末取代CMC medium中的CMC成分，配製成稻稈、玉米秸及稻穀殼培養基，以高溫高壓滅菌後即可作為實驗之用。

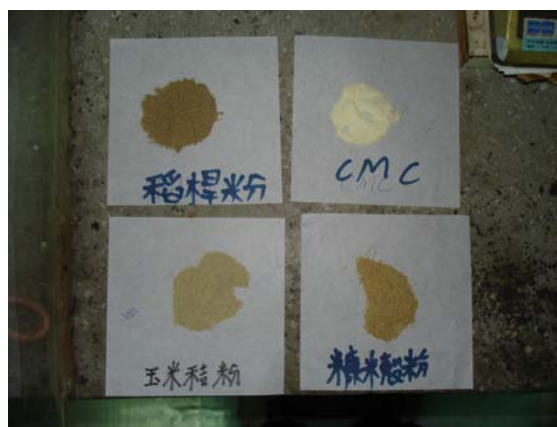


圖10. 各種培養基之粉末

### 3. 營養瓊脂培養基 (Nutrient Broth, NB)

主要的成分為 15 g peptone (special)、3 g yeast extract、6 g sodium chloride 和 1 g dextrose，溶於 1 公升水中，滅菌後即可用來作為液體培養和保存實驗菌種之用。

### 4. 酵母菌液態搖瓶培養基

此培養基為酵母菌大量培養時，所使用的培養基配方，亦可用於發酵的實驗之發酵培養基。

表三 液態活化培養基

Material	Concentration
glucose	20.0 g
yeast extract	6 g
peptone	6 g
$K_2HPO_4$	2 g
$KH_2PO_4$	4 g
$MgSO_4$	2 g
$(NH_4)_2SO_4$	2.5 g

### 5. 酵母菌冷凍保存培養基

以表四冷凍保存培養基大量培養後取2ml 菌液，加入80% 甘油2ml，混合均勻後置入-80°C的冷藏櫃保存。

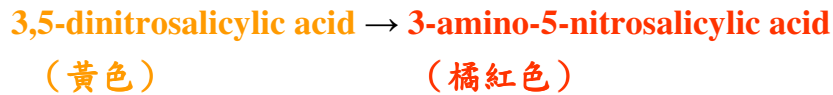
表四 冷凍保存培養基

Material	Concentration
glucose	20.0 g
yeast extract	5 g
peptone	10 g

### 三、醣類檢測試劑

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 試劑之反應，是利用 DNS 具還原力 (reduction) 之特性，將碳水化合物中具有 free 或 potentially free 之醛或酮之 group 即能在鹼性溶液中有還原的能力，而進行以下的反應：

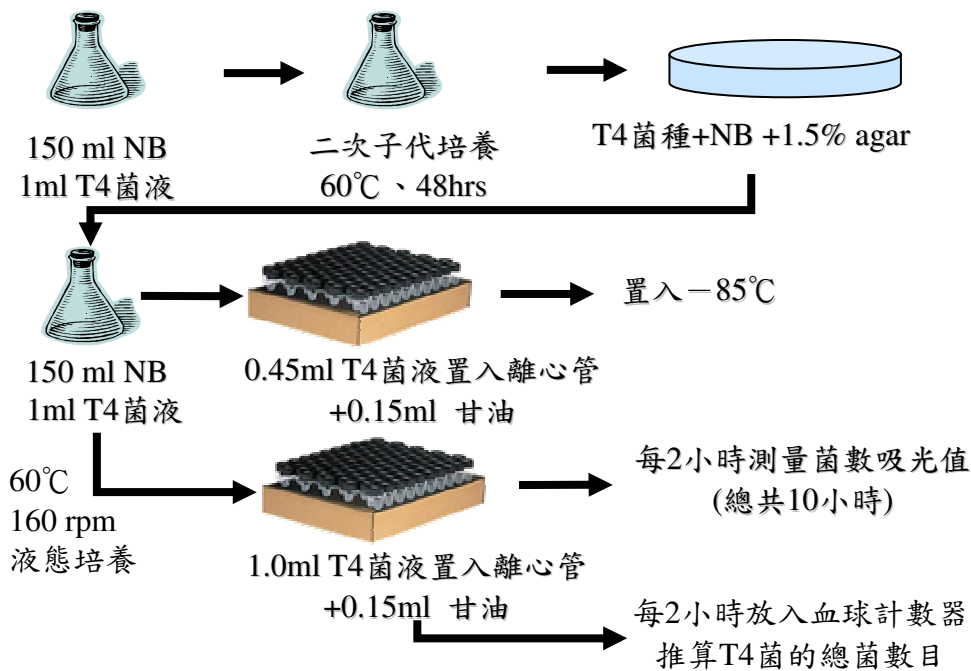
reduction



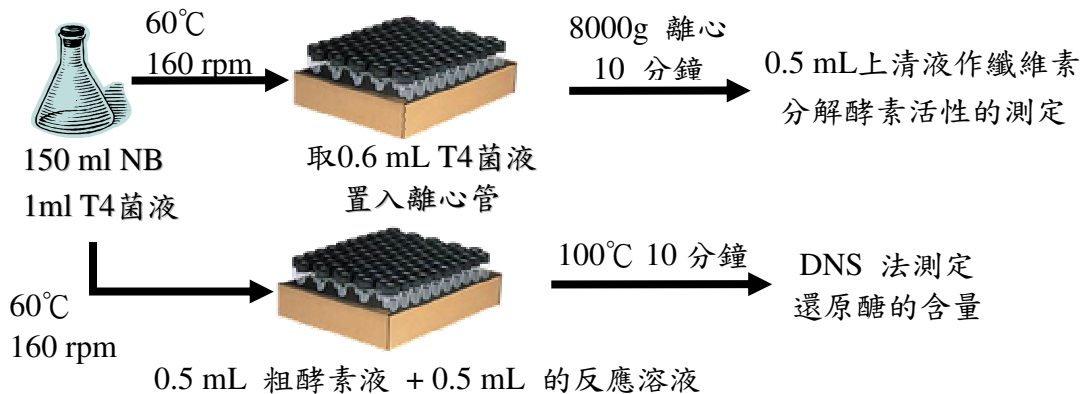
因此，可由其顏色變化之特性來作醣類反應的測試。DNS 試劑的主要成分為 1 g DNS、30 g rochelle salt 和 1.6 g NaOH 再加二次去離子水 (double distilled H<sub>2</sub>O) 至 100 mL。

### 四、T4 菌株的培養方法：

◎ 液態培養、活化與總生菌數的測定

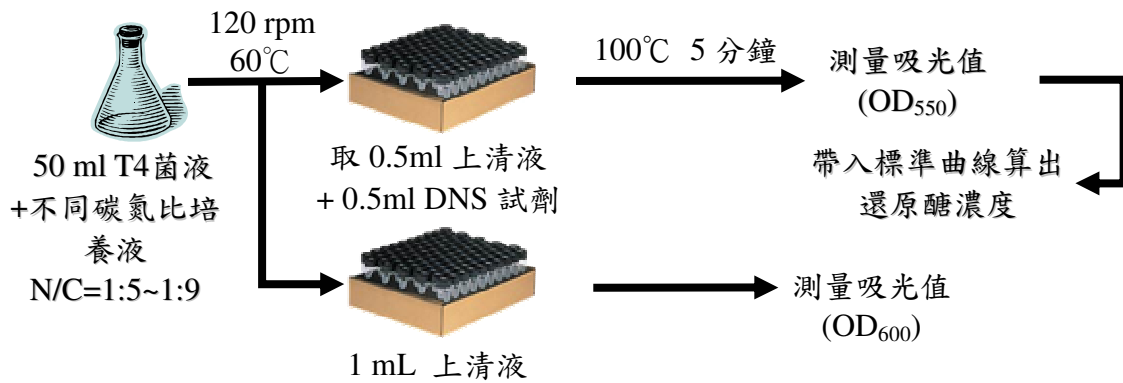


### 五、酵素活性測定

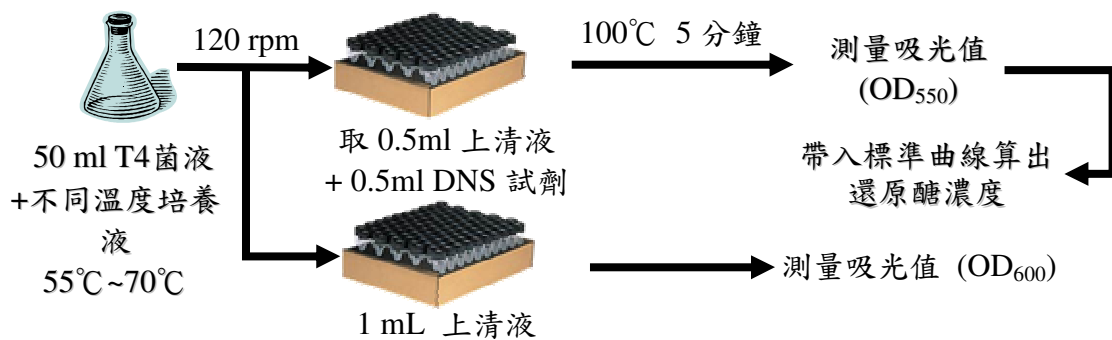


## 六、T4 培養基環境條件測定

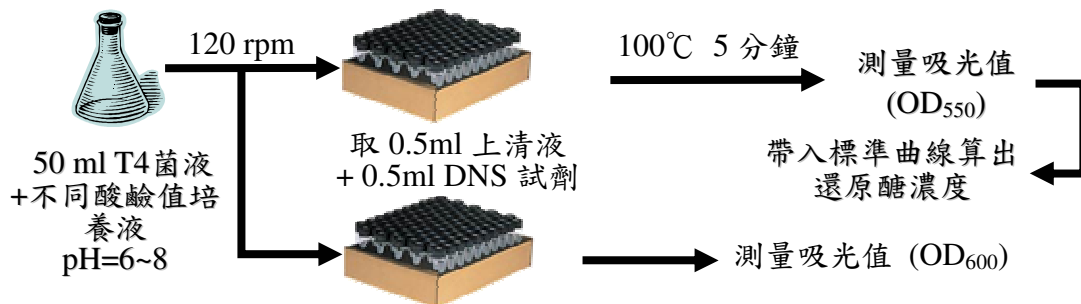
### 1. 不同氮碳比環境分解效果測量



### 2. 不同溫度環境分解效果測量

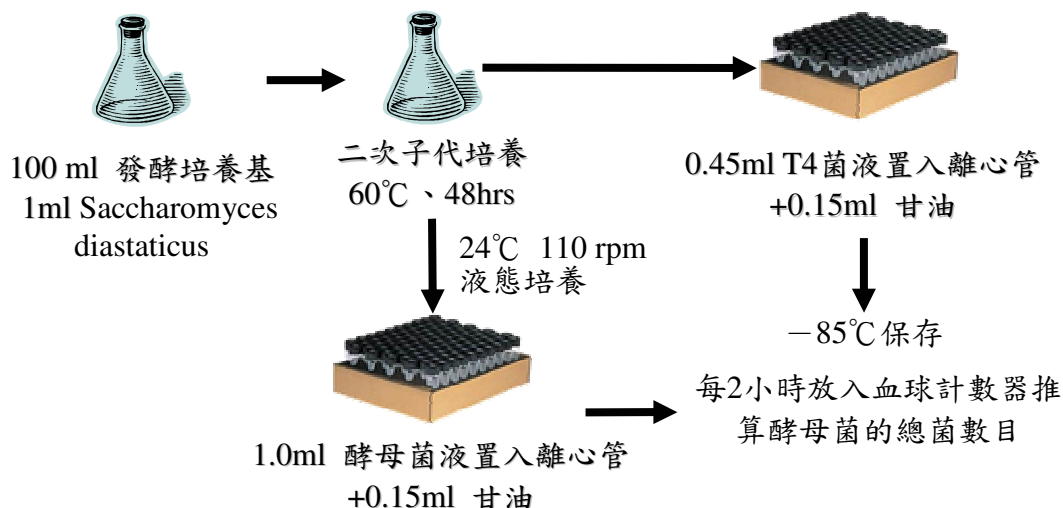


### 3. 不同酸鹼值環境分解效果測量



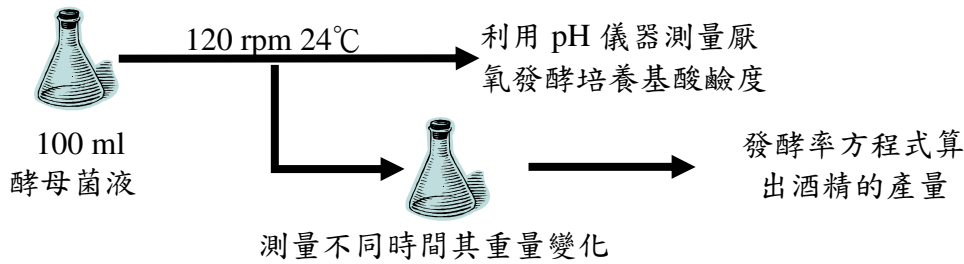
## 七、酵母菌培養方式

### ◎ 液態培養、菌株的保存與總生菌數的測定



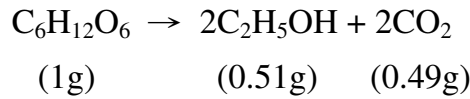
## 八、酵母菌厭氧培養環境條件測定

### ◎ 培養基 pH 值測定與酵母菌發酵率測量



### ◎ 酒精產量計算方式

酵母之酒精發酵理論式由 Gay-Lussac 所導出，故稱為 Gay-Lussac equation，如下式所示：



根據上式，理論上由葡萄糖可得 51.1% 之酒精收率。故酵母之酒精發酵率依下列公式計算：

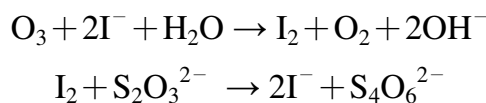
$$\text{發酵率}(\%) = \frac{(A - B) \times \frac{51.1}{48.9}}{\text{總糖可得酒精之理論值}} \times 100$$

A：最初之總重量(g)，B：發酵終了之總重量(g)

根據酒精發酵的基本反應式，1 g 葡萄糖能夠產生 0.51 g 酒精和 0.49 g 二氧化碳，因此二氧化碳所減少的重量乘以 0.51 除以 0.49，則相當於酒精生成量。

### ◎ 臭氣的標定：

採用 Standard Method 20<sup>th</sup> edition (1998) 的定量法，利用 KI 與臭氣作用，臭氣會將碘離子氧化成碘分子呈黃褐色，再以  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  滴定還原，以滴定量、當量濃度、通氣時間來推算臭氣的濃度。其氧化還原的反應式如下：



1. 將臭氣通入一個裝有 2% KI (400mL) 具遮光效果的錐形瓶中，通氣 10min 後，結束反應。
2. 將反應後 KI 吸收液，倒入燒杯中，加入 1N 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  20mL，使 pH 值降至 2 以下。
3. 再以 0.1N 之  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  滴定至淡黃色，再加入 1mL 之澱粉指示劑後，繼續滴定至藍色消失，計算其滴定量。

4. 計算出單位時間內水溶液吸收臭氣的濃度  $\Rightarrow$  臭氣容量(mg/min) =  $[A \times N \times 24] / T$

(A： $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  的滴定量(mL)    N： $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  的當量濃度    T：臭氣通入時間)



## 陸、結果與討論

由「願景與假說」的結果(圖 6.)中發現稻穀殼在 2 小時後即有 21.50%的產率，但這樣的產率仍不是我滿意的，因此我設計以下七部份的實驗，以期提高廢棄纖維素轉化為還原糖的產率，降低轉化成本。

### 第一部份 調整不同培養基中氮碳比對還原糖產率的影響

#### ◆ T4 菌株分解不同氮碳比的 CMC(未蒸煮)培養基還原糖產率的比較

我們以 CMC 培養基做試驗，調整其中氮碳比，由圖 11.可知，N:C=1:9，反應時間為 6 小時，有最高還原糖產率 26.89%，較之於原先的 8.49%，產率大幅提升約 3 倍，由此可知，**改變培養基中的氮碳比可以有效的提升還原糖的產率**，因此以下實驗，我們改變稻桿與稻穀殼培養基中氮碳比，同時加入蒸煮爆碎的手續，以期能更大幅的提升二者還原糖的產率。

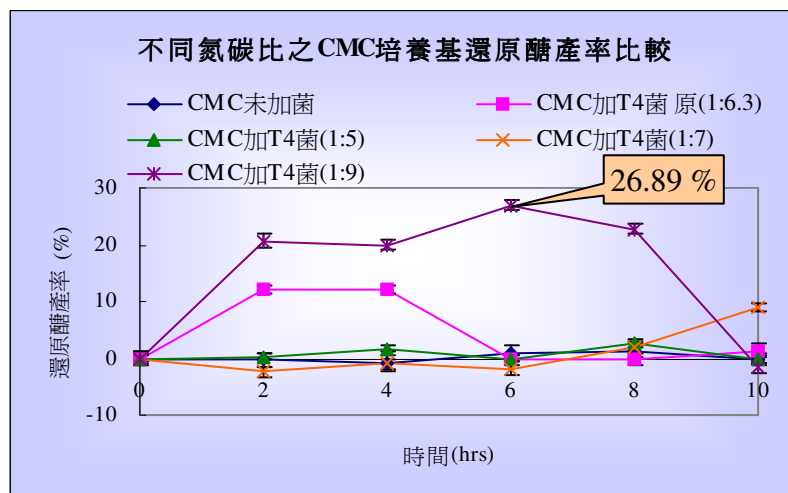


圖 11. CMC 在不同氮碳比培養基中還原糖產率比較圖

### 第二部份 將纖維素預作蒸煮爆碎對還原糖產率的影響

#### (一) 不同氮碳比的稻桿培養基在未蒸煮與已蒸煮的條件下還原糖產率的比較

由圖 12.可知，稻桿在未預先蒸煮得情況下，調整培養基氮碳比，確定能將還原糖的產率有所提升，以 N:C=1:9 的培養基在 6 小時有 15.11%的最高產率，但仍舊不是我們滿意的，因此嘗試再將稻桿在未加菌之前先以 6Kg/cm<sup>2</sup> 的壓力、126°C 的溫度蒸煮，利用瞬間減壓爆碎細胞壁，再加入 T4 菌株進行反應，由圖 12.~圖 13.可知，同樣在 N:C=1:9、反應時間為 6 小時的條件下，稻桿未蒸煮與已蒸煮的還原糖產率依次為 15.11% 與 37.41%，可知**將纖維素預先蒸煮是可以提升還原糖的產率**，更何況因為學校設備的關係，並不能夠再增加溫度與壓力，否則應可預期有更高的還原糖產率才對。

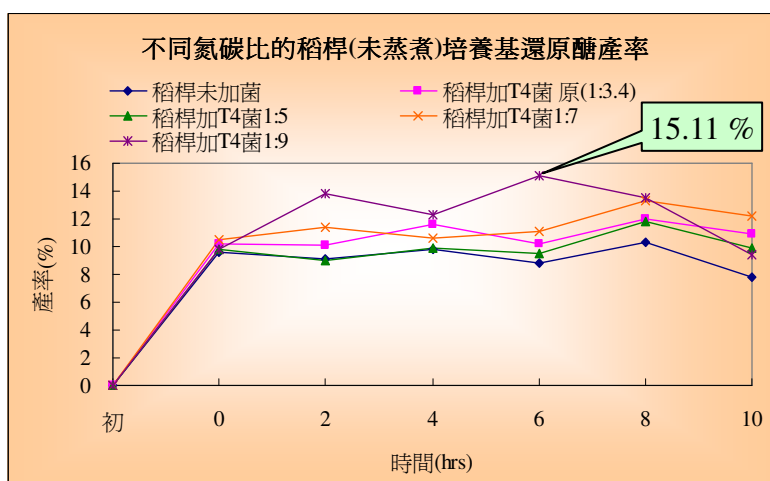


圖 12. 未蒸煮的稻桿在不同氮碳比培養基中還原醣產率比較圖

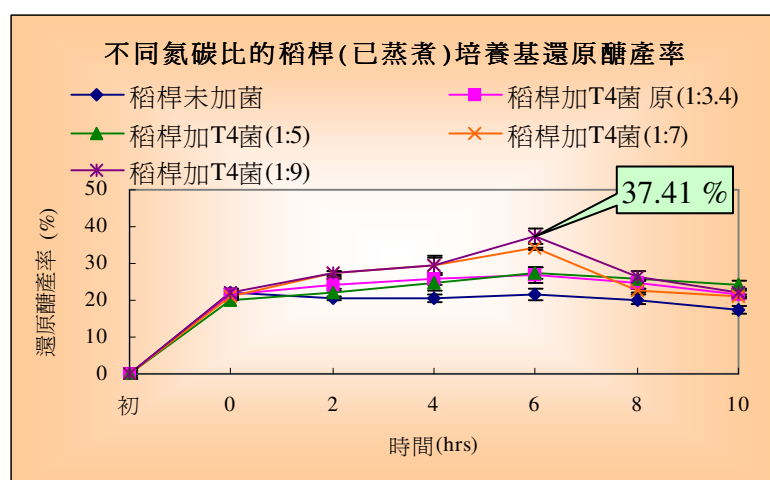


圖 13. 已蒸煮稻桿在不同氮碳比培養基中還原醣產率比較圖

## (二) 不同氮碳比的稻穀殼培養基在已蒸煮的條件下還原醣產率的比較

我們也嘗試將稻穀殼先蒸煮再加 T4 菌株進行反應，由圖 14.可知，在 N:C=1:7、反應時間同樣為 6 小時的條件下，**還原醣的產率高達 51.66%**。由於原先各種纖維在最原始的條件下，也是以稻穀殼在 2 小時即有 21.50%的還原醣產率最佳，所以我們決定以稻穀殼尋找最佳的反應 pH 值與溫度。

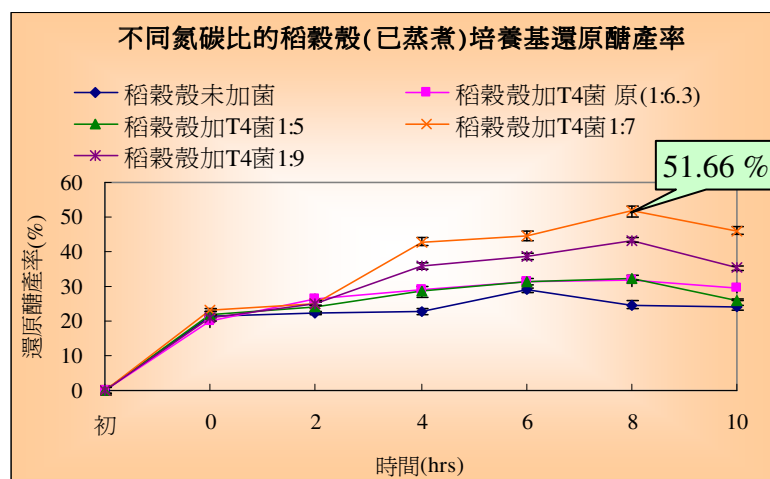


圖 14. 稻穀殼(已蒸煮)在不同氮碳比培養基中還原醣產率比較圖

### 第三部份 針對稻穀殼進行纖維素分解為還原糖之反應最佳化條件探討

#### (一) 調整稻穀殼培養基氮碳比與纖維預先蒸煮對還原糖產率的影響

在不同氮碳比稻穀殼培養基中加入 T4 菌之後，利用測量吸光值的方法，探討 T4 菌在不同培養基的生長情形；由圖 15.中發現，稻穀殼在 N:C=1:7 的培養基較適合 T4 菌的生長，而 8 小時之後，T4 菌的死亡速度大於生長速度於是菌數有下降的趨勢。

在不同稻穀殼培養基中加入 T4 菌之後，以 DNS 還原糖測量法，測量其 DNS 吸光值以探討 T4 菌是否能有效的將不同稻穀殼培養基分解為還原糖，由圖 16.中發現，各個培養基經過蒸煮後，其 DNS 吸光值有明顯的上升，而無菌的培養基在蒸煮後(即 0 小時起)呈現平穩的狀態，加菌的培養基則皆有上升的趨勢，到達 8 小時之後，各個培養基的 DNS 吸光值皆達到最大值，其中以氮碳比 1:7 的吸光值有最高值。由圖 17.中得知本研究所培養之 T4 菌在稻穀殼培養基氮碳比為 1:7 時，其分解纖維素的能力最佳，有最高產率 51.66%，相較於最原始產率 21.50%，明顯有大幅度的產率提升。

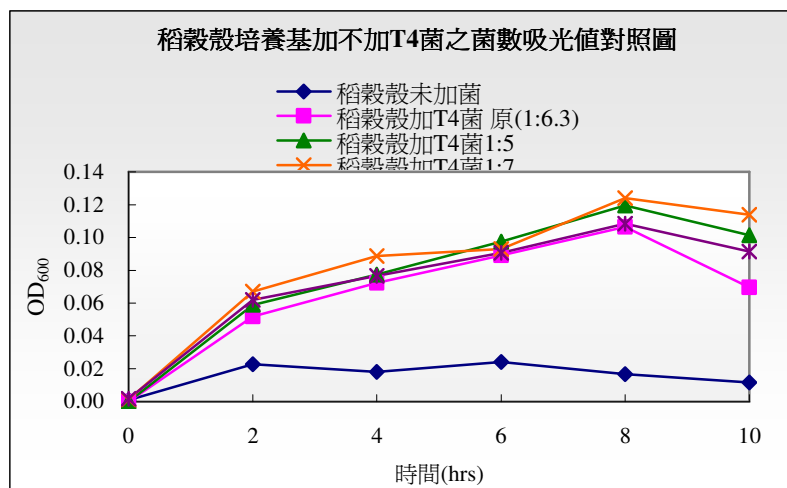


圖 15. T4 分解不同氮碳比稻穀殼培養基菌數吸光值對照圖

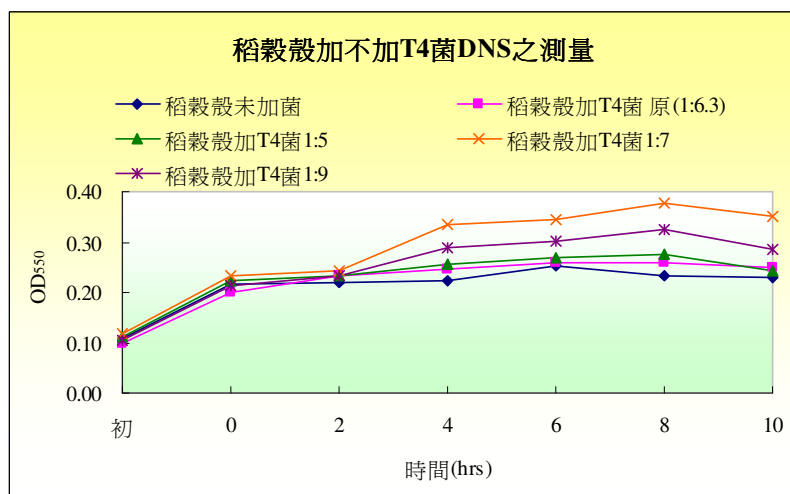


圖 16. T4 分解不同氮碳比稻穀殼培養基 DNS 吸光值對照圖

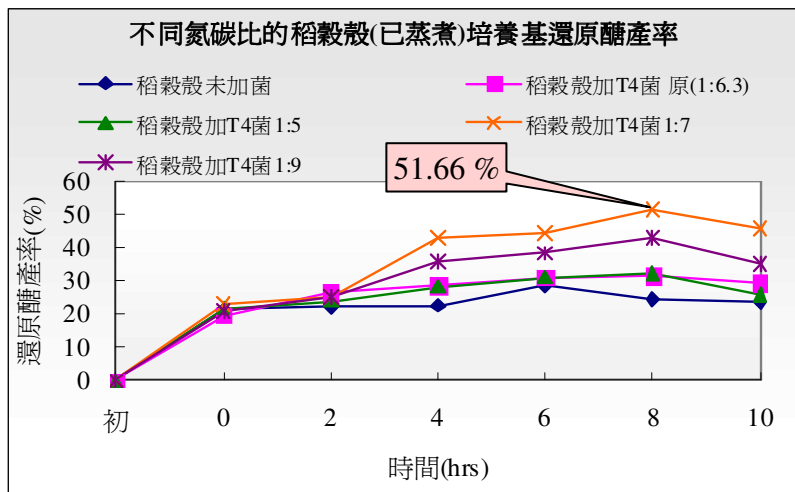


圖 17. T4 分解不同氮碳比稻穀殼培養基還原醣產率對照圖

## (二) 定溫 60°C 下培養基在不同酸鹼值中稻穀殼的還原醣產率比較

將溫度控制在 60°C，調整稻穀殼培養基在不同酸鹼度，由圖 18.中發現，無菌的稻穀殼培養基隨著時間的增加呈現穩定值，而加菌的稻穀殼培養基，其菌數吸光值隨時間增加有上升的趨勢，在 10 小時之後各個培養基皆達到最高值，其中以 pH=8 的培養基有最高值；但 pH=5~8 的稻穀殼培養基均適合於 T4 菌的生長，且 10 小時之後，T4 菌的菌數仍有繼續上升的趨勢。

由圖 19.中發現，各個培養基吸光值皆有上升的趨勢，至 10 小時時則以 pH=6 最高，這樣的結果頗為理想，因為一般狀況下，水的 pH 值在 6 附近，我們配藥時較為方便。

將圖 19.的還原醣產量換算為產率可得圖 20.，由圖 20.中得知，在定 60°C 下酸鹼度 pH=6 時，其有最高產率 51.34%，這個結果與圖 17.有極為近似的結果(51.66%)，而這二次實驗都是在 pH=6 及 60°C 的環境下進行實驗的。

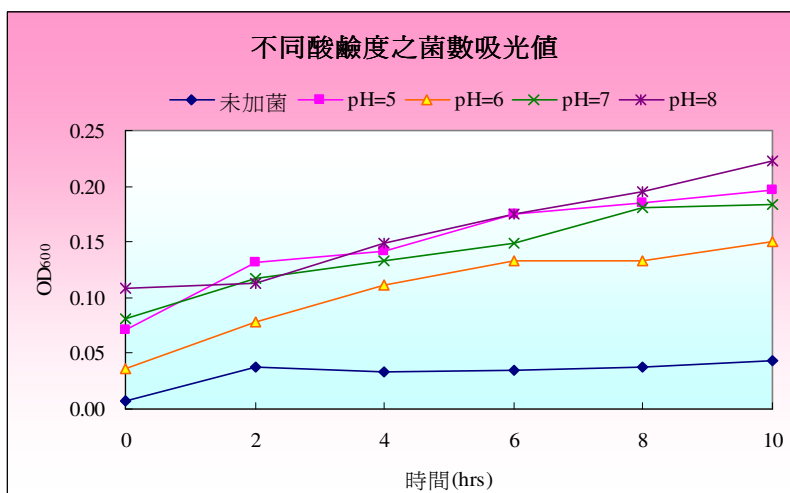


圖 18. T4 菌株在不同酸鹼度稻穀殼培養基中菌數吸光值對照圖

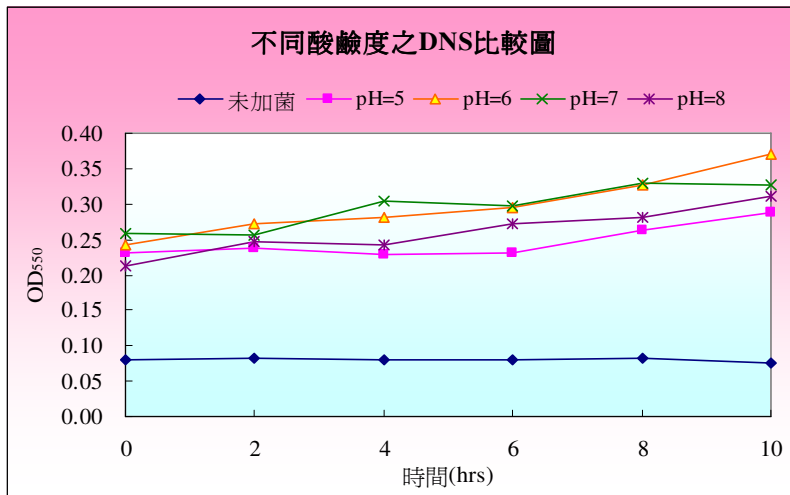


圖 19. T4 菌株在不同酸鹼度稻穀殼培養基中 DNS 吸光值對照圖

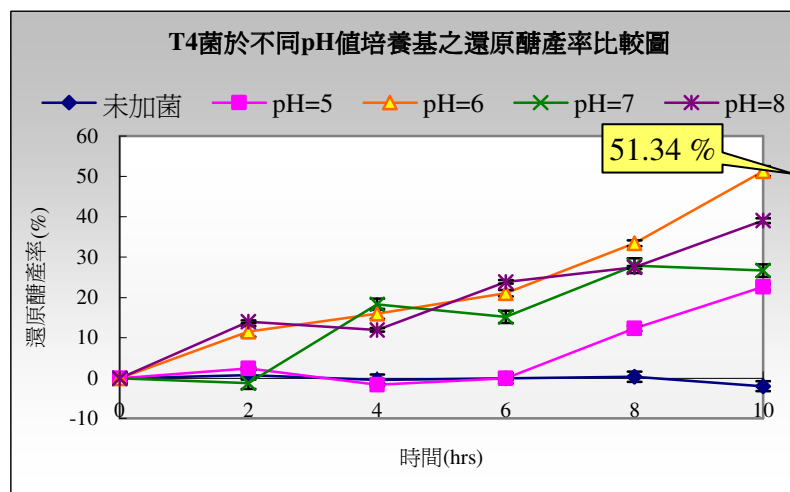


圖 20. T4 菌株在不同酸鹼度稻穀殼培養基中還原醣產率對照圖

### (三) 不同溫度下稻穀殼還原醣產率的比較

由於菌株在太低或太高的溫度下均不適合生長，因此本實驗僅針對 55°C~70°C 進行研究，由圖 21.可知，在 pH=6 的條件下 T4 菌株對稻穀殼的分解，不同溫度下其還原醣的產率有極大差異，但以溫度 65°C、反應 10 小時，可高達 69.81%的還原醣產率。

實驗至此，我們已初步找到已 T4 菌株降解農業廢棄纖維素的最佳化條件為以經過蒸煮的稻穀殼在培養基 N : C=1 : 7、pH =6 且溫度為 65°C 時，反應 10 小時即有高達 69.81%的還原醣產率。



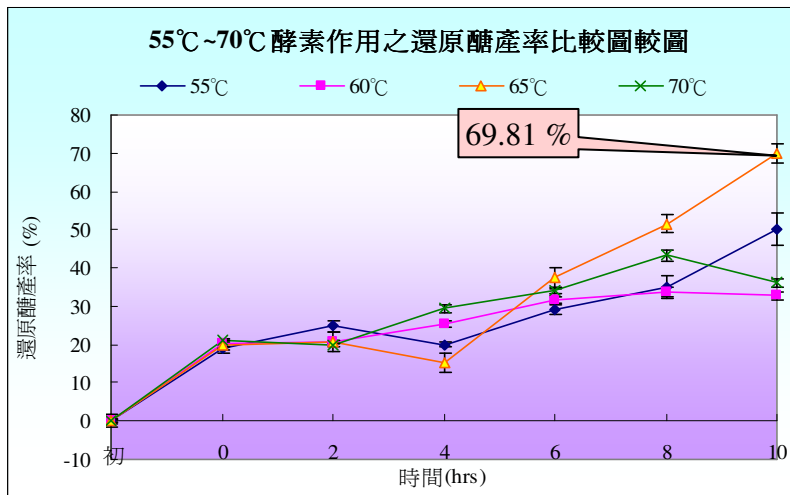


圖 21. T4 菌在 55°C~70°C 溫度下分解稻穀殼其還原糖產率對照圖

接下來，我們將生產纖維酒精的工作，交予酵母菌來執行。

#### 第四部份 以酵母菌行酒精發酵製備纖維酒精

##### (一) 酵母菌發酵率測量

表五 稻穀殼 T4 菌反應後試液厭氧培養與對照實驗數據表

	厭氧培養基對照組	稻穀殼 T4 菌反應後試液厭氧培養
A 最初之總重量(g)	224.55	200.30
B 發酵終了之總重量(g)	221.50	198.80
總糖可得酒精之理論值(g)	1.02*	0.899551**
<b>發酵率 (%)</b>	<b>66.6%**</b>	<b>69.42%***</b>

\* 對照組厭氧培養基中每 100mL 含有 2g 葡萄糖；理論上，1g 葡萄糖可產生酒精 0.51 克。

\*\*由於實驗過程需同時測量 pH 值，而 pH meter 每進出試液一次，試液便損失 0.15g，對照組中共測量 16 次，所以減少的重量中有  $0.15 \times 16 = 2.4g$  是在測量 pH 值時所損失，因此， $A - B = 224.55 - 221.5 - 2.4 = 0.65$ 。

$$\therefore \text{發酵率}(\%) = \frac{0.65 \times \frac{51.1}{48.9}}{1.02} \times 100 = 66.6\%$$

\* 原 T4 菌株反應後試液中測其 DNS 值得其中含糖量，每 100mL 中有 1.763825g，故  $1.763825 \times 0.51 = 0.899551$ 。

\*\*\*原 T4 菌株反應後試液共測 pH 值 6 次，因此， $A - B = 200.3 - 198.8 - (0.15 \times 6) = 0.6$ 。

$$\therefore \text{發酵率}(\%) = \frac{0.6 \times \frac{51.1}{48.9}}{0.899551} \times 100 = 69.42\%$$

由圖 22.結果可知，與發酵培養基混合的酵母菌可生長繁殖，並且發揮其分解還原糖為酒精的功能，因此在厭氧發酵培養基中，結果可以證明，*Saccharomyces diastaticus*

有不錯的發酵能力。

本研究同時證實由稻穀殼加 T4 菌株反應後試液的厭氧培養基，以 *Saccharomyces diastaticus* 菌株進行酒精發酵，可以有 69.42% 的發酵率，日後我們除了會再將產生之酒精加以蒸餾純化，還會持續研究，以期能將纖維酒精的產率再提升。

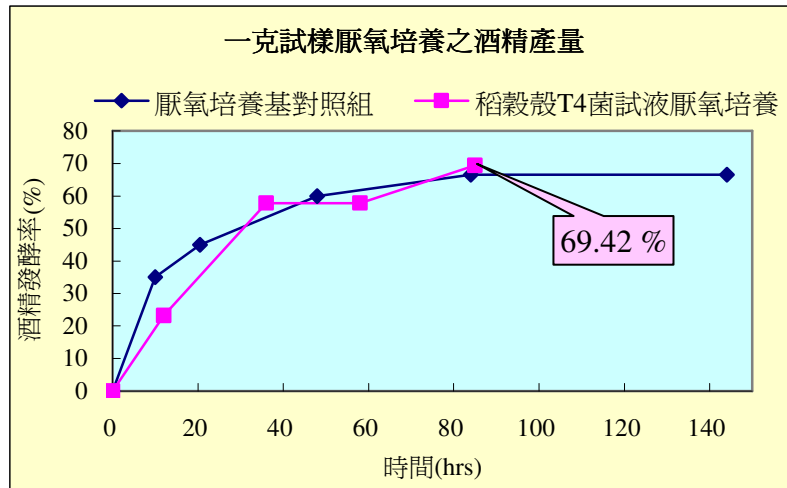


圖 22. *Saccharomyces diastaticus* 菌株之酒精發酵率

## (二) 培養基 pH 值測定

將 100 ml 的菌液置於 100 ml 厭氧發酵培養基中，以 120 rpm 振盪培養，每一小時將厭氧發酵培養基置入無菌操做台內，先以酒精擦拭 pH 儀器，並以標準液校正，再利用其測量厭氧發酵培養基酸鹼度。

由圖 23.發現當酵母菌在初期時，會進行大量繁殖且產生二氧化碳，使得酸鹼值快速下降，當下降速率平緩後，因為環境負荷量的緣故，使酵母菌生長繁殖也達到平衡，酒精產量也因此下降。

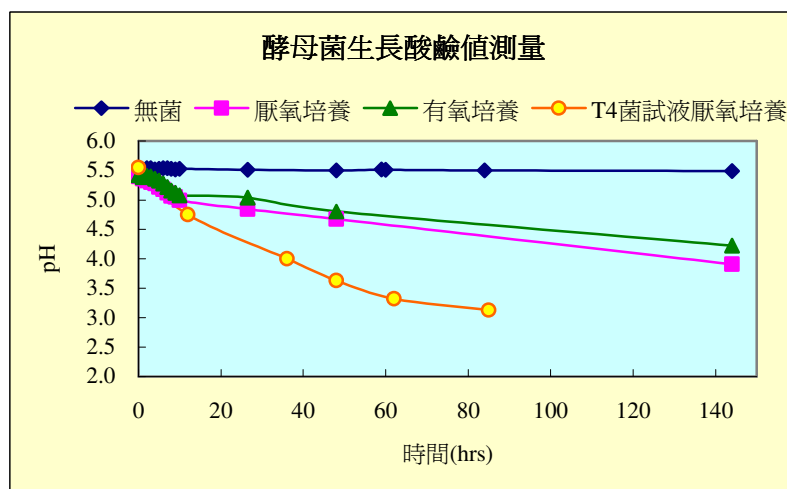


圖 23. *Saccharomyces diastaticus* 菌株之生長過程酸鹼值測量

### (三) 不同毫升數酵母菌之 T4 菌試液發酵率測定

分別將 10mL、30mL、50mL 的酵母菌液加入 T4 菌株反應後的試液中，比較其酒精發酵率的不同。由圖 24.可知，**當酵母菌液體積為 30mL 時，在 72 小時酒精發酵率達到 79.89%**；事實上，在發酵 24 小時後，酒精發酵率也已經有 76.18%，由此可知，本實驗所設計的流程在最佳化條件下，總計反應約 34 小時後，將纖維素轉換為纖維酒精的產率至少已達 28% 以上；至於酵母菌液體積愈多，酒精發酵率並無愈多的趨勢，我們認為愈多的酵母菌應該會產生較多的酒精，但酵母菌的酒精耐受度有一定的限值，因而影響酵母菌的存活，所以加入愈多的酵母菌不見得會有愈高的酒精發酵率。

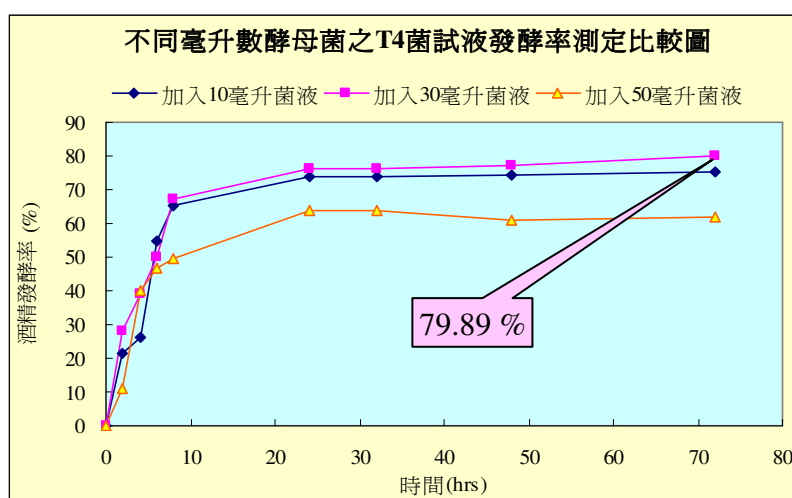


圖 24. 不同毫升數酵母菌之 T4 菌試液發酵率測定比較圖

實驗至此雖有不錯的產率，但我們還是希望能再提升還原糖產率，讓纖維酒精的轉化率再提高，所以我們參考 49 屆高市科展的作品設計在低溫(0°C)、高濃度臭氧(49.9mg/min)、不加酸的情況下，探討臭氧是否能將農業廢棄纖維素切成小分子的纖維素或寡糖，甚或是還原糖。

### 第五部份 探討纖維先以臭氧斷鏈處理對還原糖產率是否有提升

我們不加酸純粹只在低溫下通入臭氧反應，沒有廢酸污染、沒有加熱和廢棄物處理的問題。由於氣體在水中有溶解度問題，因此我們利用愈低溫氣體溶解度愈高的原理，由圖 25.得知，臭氧接觸時間愈長纖維素被切為小分子的機會愈多，通入時間超過 1 小時的就比未用臭氧處理的有較多的還原糖產量，通入 2 小時臭氧後的纖維已有 36.02% 的還原糖產率，若再加以蒸煮產生之還原糖產率(46.51%)則為未以臭氧處理(23.16)的 2 倍左右，可知**纖維預先以臭氧斷鏈，確可有效提升還原糖產率。**

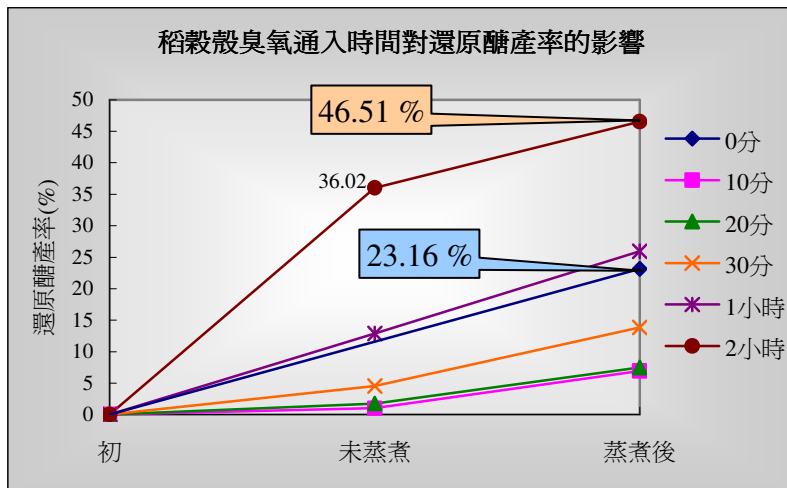


圖 25. 稻穀殼通入臭氧時間對纖維素斷鏈的效果比較圖

通入臭氧且已蒸煮過的稻穀殼，在加入 T4 菌株後以最佳化條件處理，我們原先預期應該可以大幅提升還原醣產率，但由圖 26.結果卻得到產率沒有上升反而下降的趨勢。我們認為這是因為 T4 菌分解纖維素的產物中可得還原醣，因此還原醣濃度高時，便會抑制 T4 菌的降解能力，造成在加入 T4 菌後產率並無上升的趨勢。經與原先最佳化條件下的結果比較，由圖 27.我們認為，若先將纖維素經過高溫蒸煮爆碎，接著以 T4 菌進行分解，最後再利用通入臭氧來提升還原醣產率，便可得到最高的還原醣產量。

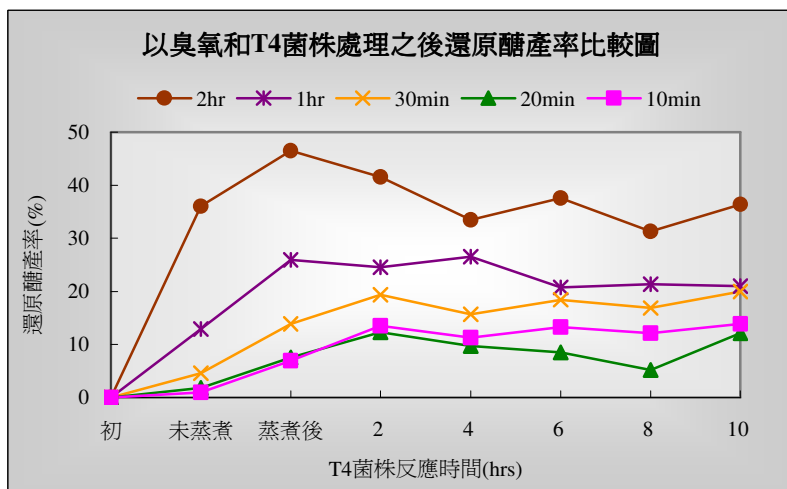


圖 26. 稻穀殼通入臭氧處理後在加入 T4 菌株反應後還原醣產率比較

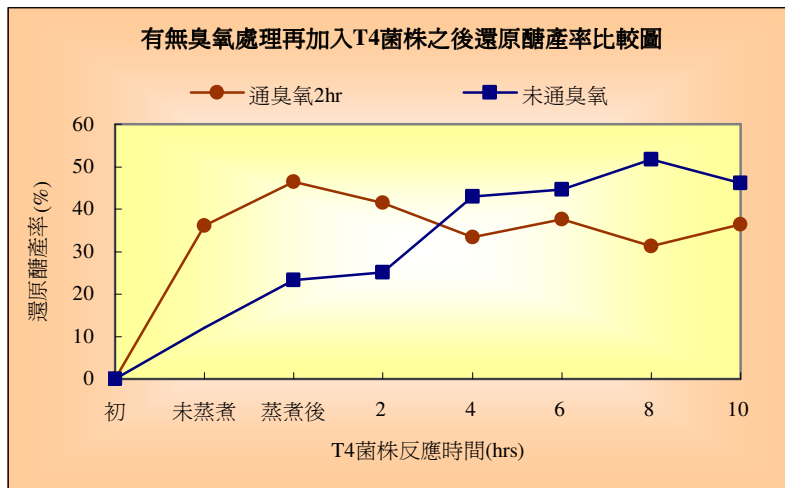
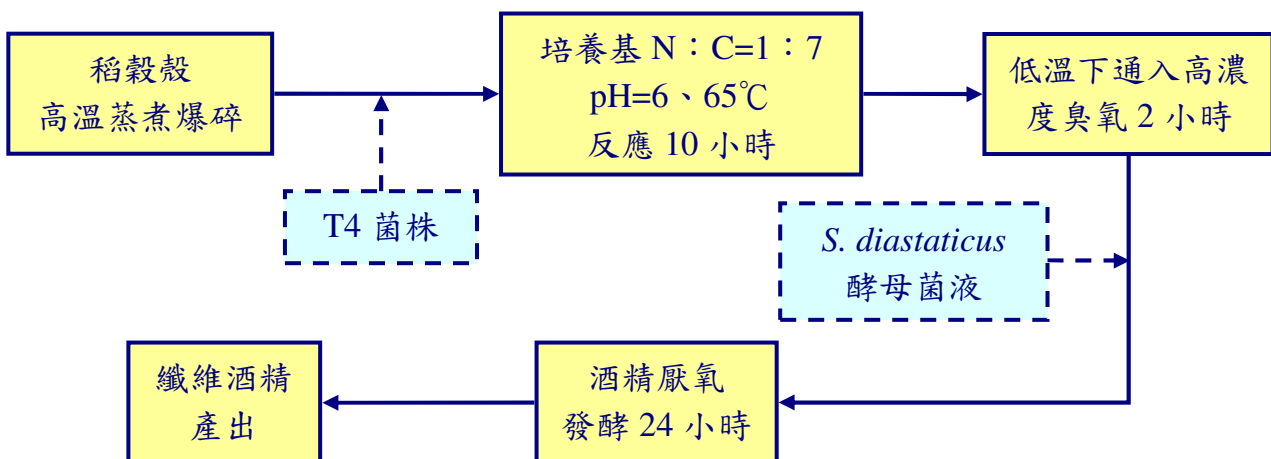


圖 27. 稻穀殼有無臭氧處理在加入 T4 菌株之後最佳化條件下還原糖產率比較圖

◎ 纖維酒精有效製程的建議流程

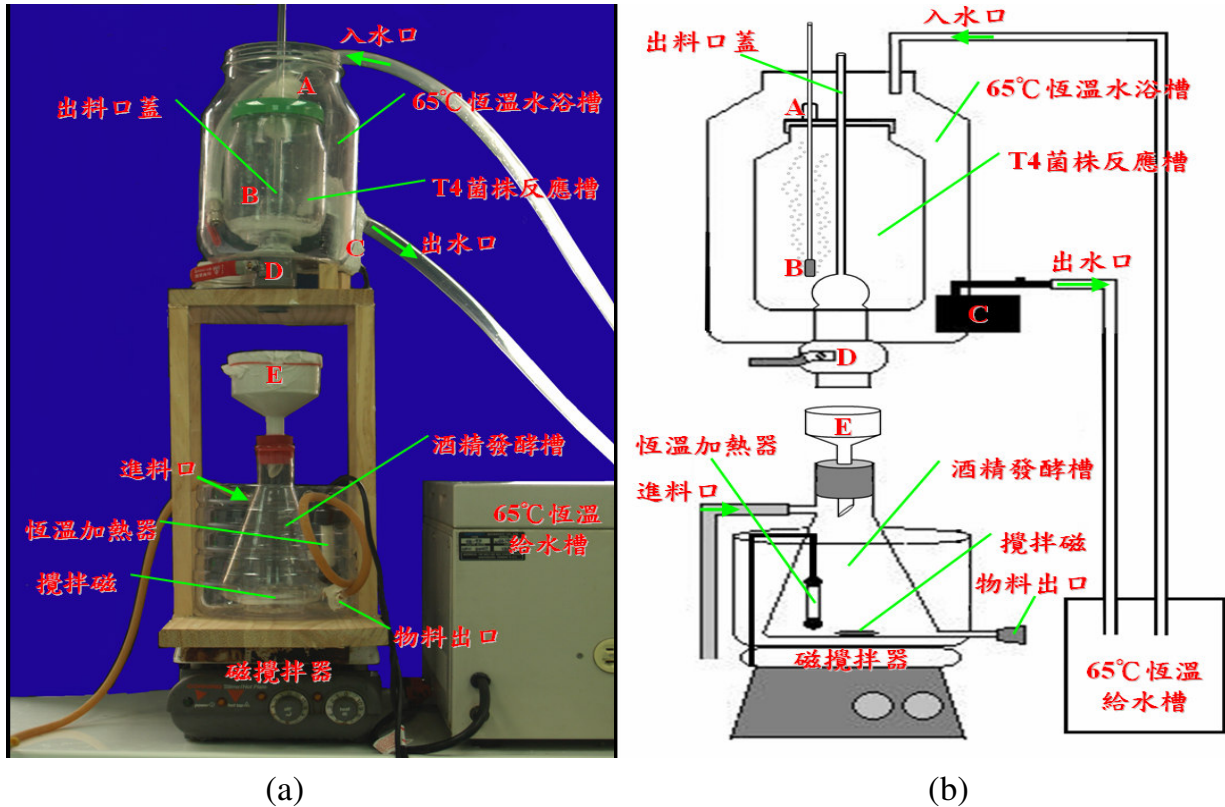


這樣的結果不僅已跳脫學術研究階段，在實際應用上也算有大突破了，讓我十分振奮！於是下一階段我希望生產纖維酒精的過程能更節能與方便化，因此展開微型纖維酒精反應器的製作。



## 第六部份 自製生質酒精反應器

為了考慮以農業廢棄纖維素為原料製作纖維酒精的過程，不增加其他能源的耗損，所以我們構想自製一個微型化的纖維酒精反應器，以達到隨處是工廠之目的。以下是我們自製酒精反應器之詳細構造圖：



照片中：(a)實際裝置圖，(b)裝置示意圖。

A 為通氣孔，B 為電動攪拌裝置，C 為沉水式抽水馬達，D 為開關，E 為三層過濾裝置，第一層過濾未反應纖維素等粗雜質，第二層為活性碳吸附棉，吸附細微雜質，第三層則為  $1\mu\text{m}$  孔徑的 P.P.棉，過濾 T4 菌株用(T4 菌體大小為長  $1-5\mu\text{m}$ ，寬  $0.7-1\mu\text{m}$ )

## 第七部份 纖維酒精製程中，耗能與產能之比較

由以下計算得知**實驗過程總耗能為25154 kJ**，而依據本實驗的產率計算，約需用3kg(3.02013kg)的纖維素來進行分解，才能抵銷製程中所消耗之能量；在保守估算下，本實驗所使用的滅菌釜一次可置入7kg的纖維素，在最佳化反應條件下，轉化的酒精以莫耳燃燒熱計算，**共可得約58303.3 kJ的能量，此能量約為實驗耗能之2.3倍**，因此我可以證明本實驗能夠由廢棄纖維素中得到更多的能量，**真正達到綠色能源之訴求**。

儀器	功率(W)	使用時間(s)	消耗總能量(kJ)
恆溫器 <sup>(1)</sup>	25	36000	908
磁攪拌器 <sup>(2)</sup>	250	86400	21600
打氣泡機 <sup>(3)</sup>	3.5	36000	126
滅菌釜 <sup>(4)</sup>	2000	900	1800
臭氧機 <sup>(5)</sup>	100	7200	720

(1)  $25\text{W} \times 36000\text{s} \div 1000 = 908 \text{ kJ}$

(2)  $250\text{W} \times 86400\text{s} \div 1000 = 21600 \text{ kJ}$

(3)  $3.5\text{W} \times 36000\text{s} \div 1000 = 126\text{kJ}$

(4)  $2 \text{ kW} \times 900\text{s} = 1800\text{kJ}$

(5)  $100\text{W} \times 7200\text{s} \div 1000 = 720 \text{ kJ}$

※ 總耗能為 **908+ 21600+ 126+1800+720=25154 (kJ)**

若採用本實驗保守的纖維素轉化為酒精之比例：28%，酒精之莫耳燃燒熱為1368.3kJ，因此本實驗相對所需纖維素共為：

$$25154 \text{ kJ} \div 1368.3 \text{ kJ/mol} = 18.3834 \text{ mol}$$

$$18.3834 \text{ mol} \times 46 \text{ g/mol} = 845.6364\text{g}$$

$$845.6364\text{g} \div 280\text{g/kg 纖維素} = \mathbf{3.02013 \text{ kg 纖維素}}$$

一次使用 7 kg 稻穀殼纖維素，利用本實驗所找到最佳化條件可製得：

$$7000\text{g} \times 28\% \div 46 \text{ g/mol} = 42.61 \text{ mol}$$

$$42.61 \text{ mol} \times 1368.3 \text{ kJ/mol} = \mathbf{58303.3\text{kJ} > 25154 \text{ kJ}}$$

## 柒、結論

嗜高溫好氧菌*Geobacillus thermoleovorans* T4，是被報導具有纖維素分解能力的菌株，但僅止於學術研究階段。本研究以CMC作為對照實驗，成功地獲得下列重要結果：

1. 確定T4菌株可以分解農業廢棄纖維素，且醱產率稻桿在4 hrs有1.06%，稻穀殼在2 hrs有4.38%，玉米秸則不理想；以CMC培養基調整氮碳比後，發現的醱產率可大幅提升至有26.89%(1:9)；植入菌株前以蒸煮處理，稻桿與稻穀殼的醱產率提高為37.41% (N:C=1:9) 與51.66% (N:C=1:7)；最後，針對稻穀殼發現在65°C、pH=6時，醱產率可高達52.67%。
2. 將稻穀殼在最佳條件下以T4菌株反應後之溶液，植入*Saccharomyces diastaticus*酵母菌，酒精發酵率有69.42%。最後在加入不同毫升的酵母菌進行比較後，發現酒精發酵率最高能夠達到79.89% (試液：菌液=10:3)，而酵母菌在30%的酒精培養基中仍可存活，同時行出芽繁殖，顯示此菌株有高的酒精耐受度。
3. 本纖維酒精製程在最佳化反應條件下，反應34小時即有28%酒精產率，而產出的能量約為58303.3kJ，為本實驗耗能之2.3倍，因此本實驗所設計之製程能夠真正達到綠色能源之訴求。
4. 纖維預先以臭氧斷鏈，確可有效提升還原醱產率；但建議先將廢棄纖維素經過高溫蒸煮爆碎，接著以T4菌株在最佳化條件下進行分解，最後再利用通入臭氧來提升還原醱產率，便可得到最高的還原醱產量。
5. 自製纖維酒精反應器，確可生產纖維酒精，目前最佳酒精產率約為24%。

由數據顯示，本研究確能從稻穀殼的纖維素培養基中，製造出第一批的纖維酒精，為台灣的能源再生創造一線曙光！

## 捌、參考資料

1. 吳奇生(民75)，利用纖維素物質發酵生產化學合成中間產物之研究，台灣大學農業化學研究所碩士論文，未出版，台北。
2. 中國生物能源與材料網，各國爭相試建纖維素乙醇，2007年11月12日，取自：[http://big5.xinhuanet.com/gate/big5/ah.inhuanet.comswcl2006/2007-07/03/content\\_10465481.htm](http://big5.xinhuanet.com/gate/big5/ah.inhuanet.comswcl2006/2007-07/03/content_10465481.htm)。
3. 經濟部能源局(民95)，台灣生質能源發展現況與展望，2007年11月12日，取自：<http://www.eysc.gov.tw/group/htm/power/%A5x%C6W%A5%CD%BD%E8%AF%E0%B7%BD%B5o%AEi%B2%7B%AAp%BBP%AEi%B1%E6-2.pdf>。
4. 董啟功(民96)，台灣生質酒精展望，中央研究院南部生物技術計畫中心，2007年11月12日，取自：[http://140.128.17.229/E2Project/speak/961017%E6%BC%94%E8%AC%9B%E5%85%AC%E5%91%8A/%E9%9D9C%E5%AE%9C%E5%A4%A7%E5%AD%B820071017-%E5%8F%B0%E7%81%A3%E7%94%9F%E8%B3%AA%E9%85%92%E7%B2%B%E5%B1%95%E6%9C%9B\(%E8%91%A3%E5%95%9F%E5%8A%9F\).pdf](http://140.128.17.229/E2Project/speak/961017%E6%BC%94%E8%AC%9B%E5%85%AC%E5%91%8A/%E9%9D9C%E5%AE%9C%E5%A4%A7%E5%AD%B820071017-%E5%8F%B0%E7%81%A3%E7%94%9F%E8%B3%AA%E9%85%92%E7%B2%B%E5%B1%95%E6%9C%9B(%E8%91%A3%E5%95%9F%E5%8A%9F).pdf)。
5. 行政院原子能委員會委託研究計畫研究報告，纖維素轉變為酒精之微生物基因工程，2007年11月12日，取自：<http://www.aec.gov.tw/www/policy/plans/files/wp095038.pdf>。
6. 胡展誌(民91)，以中溫菌進行盤固草發酵生產纖維素分解酵素及強化蛋白質，國立台灣大學農業化學研究所碩士論文，未出版。
7. 高中化學教學資訊網，問題精華區，2007年10月15日，取自：<http://www.chemedu.ch.ntu.edu.tw/QnA/temp.php?id=100>。
8. 傅益恩(民95)，高溫嗜酸菌 *Alicyclobacillus acidocaldarius* 木聚糖水解酵素 Xylanase 基因之選殖，東吳大學微生物學系碩士論文，未出版。
9. 尤智立(民92)，嗜高溫纖維分解菌纖維分解酵素的探討，國立中山大學生物科學研究所碩士論文，未出版，高雄。
10. 戴上凱(民93)，熱穩定性纖維素分解細菌分離株之特性探討與親緣關係的研究，國立中山大學生物科學研究所博士論文，未出版，高雄。
11. 楊紹榮，農業廢棄物處理與再利用，台南區農業改良場，2007年11月18日，取自：<http://www.tndais.gov.tw/Soil/b1.htm>。
12. 酵母菌的分類，2008年9月27日，取自：<http://faculty.stut.edu.tw/~c5200999/%C1%BF%B8q/%A4W%BA%F4%C1%BF%B8q%A2w04%20%BB%C3%A5%C0%B5%DF%A4%C0%C3%FE.pdf>
13. 王啟約(民96)，山藥酒的製造研究，國立屏東科技大學食品科學系碩士學位論文，未出版。

14. 鄧德豐(1987)，應用微生物學，睿煜出版社，屏東，台灣。
15. 劉于菱(民94)，百香果酒製程之研究，輔仁大學食品營養學系碩士論文摘要，未出版。
16. 沈文宜(民94)，酵母菌*Saccharomyces diastaticus* LORRE-316 利用氣舉式反應器進行酒精氣提之研究，國立中正大學化學工程研究所碩士論文，未出版，嘉義。
17. 高雄市49屆中小學科學展覽會，可不可以不要那麼酸?---低酸水解木屑最佳化條件之探討，高中組化學科，高雄女中。
18. Beguin, P., Aubert, J. P. 1993, The biological degradation of cellulose. *FEMS. Microbiol. Rev.* 13 : 25-58.
19. Bok, J.-D., D. A. Yernool, and D. E. Eveleigh. 1998. Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4774-4781.
20. Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kounde RE. 1996. Principles and practices of winemaking. New York: Chapman & Hall.
21. Cecilia, L., and J. R. Mattoon. 1984, Development of Rapidly Fermenting Strains of *Saccharomyces diastaticus* for Direct Conversion of Starch and Dextrins to Ethanol, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 48, No. 1, pp.17-25.
22. Dent DF. 1980. Mechanism of fermentation of brewing yeast in high salt concentration. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society* 14: 112-5.
23. Galazzo, J.L. and Bailey, J.E., 1990, Fermentation Pathway Kinetics and Metabolic Flux Control in Suspended and Immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 162-172.
24. Ingram, L. O., Aldrich, H. C., Borges, A. C. C., Causey, T. B., Martinez, A., Morales, F., Saleh, A., Underwood, S. A., Yamano, L. P., York, S.W., Zaldivar, J. and Zhou, S. 1999, Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotech. Prog.* 15: 855-866.
25. Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl, and I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:506-577.
26. Wood, T. M. 1985. Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochem. Soc. Trans.* 13 : 407-410.



## 【評語】 040207

本作品是十分切合新近綠能議題，也是科學界十分矚目的共同研究目標，擬將纖維素分解成能提供能源的還原糖和酒精，研究中使用中山大學培養的“T4”菌株，找到 65°C 下獲得甚佳的還原糖產率，唯在實驗數據的精確度處理上宜再略謹慎檢視，此計畫有參展國際科展潛力。