

臺灣二〇〇八年國際科學展覽會

科 別：環境科學

作品名稱：以 *Geobacillus thermoleovorans* T4 菌株轉化農業
廢棄纖維素為葡萄糖以發展生質酒精之研究

學校 / 作者：國立高雄師範大學附屬高級中學 鄭丞舜
國立高雄師範大學附屬高級中學 陳子雄

作者簡介



從小就與實驗接觸，漸漸的便對實驗深感興趣，常常在實驗之中學到了許多好玩又有趣的知識，不管是物理、化學或是生物都成了我的最愛，而在國中時期更因參加有關科展的相關比賽而對實驗更有進一步的了解以及認識，在這不間斷的過程中一直到現在，學到的不再只是實驗的結果以及原理，而是當一個科學人，真正所需要去培養態度及付出。

作者簡介



從小時候起，家中附近的公園就是我的研究室，不論是花草、昆蟲，甚至一堆小沙礫都是我的實驗對象，我對自然科學的喜愛，我敢說是不輸別人的。不論是物理、化學還是生物，都是我在探討的對象。大自然對我是多麼的奧妙，而身為一位小小科學家，這都是在成長中必須去學習的，我會靠著不斷的實驗和探討，找出這大自然真理與意義。

目 錄

中文摘要.....	4
英文摘要.....	5
壹、研究動機與緒論	6
貳、研究目的與架構	8
參、文獻探討.....	10
肆、材料與方法.....	17
伍、結果與討論.....	21
陸、結論.....	30
柒、參考資料.....	31

中文摘要

我們得知從高雄糖廠及堆肥中篩出的嗜高溫好氧菌 *Geobacillus thermoleovorans* T4，是本種細菌首先被報導具有纖維素分解能力的菌株，但目前僅止於學術研究階段，尚未實際應用於廢棄纖維素的分解上。本研究以廢棄農作物纖維素取代學術研究所用的羧甲基纖維素 (Carboxymethyl Cellulose, CMC)，將 T4 菌株置於稻稈與米糠培養基內，進行分解效能比較，再利用酵母菌的發酵作用進一步將葡萄糖轉化為酒精。

本研究發現，在 60°C 的環境中，活化的 T4 菌株可在 CMC、稻稈及米糠培養基中生長繁殖且發揮其分解纖維素為葡萄糖的能力，尤其在米糠培養基中的分解效果最快也最好。此外，將生產的葡萄糖加入酵母菌之後，初步發現也能成功地進行發酵作用產生酒精，生質酒精的產出指日可待！

Using *Geobacillus thermoleovorans* T4 to Turn the Deserted Cellulose in Agriculture into glucose in Order to Produce Bio-Renewable Energy

Abstract

The Research on Using *Geobacillus thermoleovorans* T4 to Turn the Deserted Cellulose in Agriculture into glucose in Order to Produce Bio-Renewable Energy

It has been found that *Geobacillus thermoleovorans* T4, a thermophilic aerobic bacterial strain isolated from a sugar refinery wastewater (55-60°C) in Kaohsing, Taiwan, can secrete thermostable endocellulase and hydrolyze carboxymethylcellulose (CMC) in some academic research, but it is still unknown whether T4 hydrolyzes deserted cellulose in Agriculture. The aim of this study is to investigate the best conditions of T4 cellulase activity after mixing with deserted cellulose (such as rice bran and rice straw) by measuring the glucose concentration and bacteria number, and to produce the ethanol by activated yeast. T4 was added rice bran and rice straw medium, and cultured in 60°C for 10 hours. The number of T4 and the concentration of glucose were measured every two hours. The best conditions were examined by comparing the hydrolyzation efficiency of T4 in different cellulose medium. We observed that T4 grew efficiently in different cellulose medium and hydrolyzed cellulose into glucose, especially in rice bran medium. The yeast also converted glucose into ethanol. Our research may shed light to the development of bio-renewable energy!

壹、研究動機與緒論

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！

台灣良好的氣候環境，使台灣具備有發達的農業技術，因此農作物的種類及產量極為豐富，但相對地每年也製造出大量的植物纖維性廢棄物。通常我們最常看到的處理方式是使用在畜牧業的飼料上、造紙工業的原料，或者直接由焚化爐燃燒使其轉化為電能，但這些處理卻都缺乏更有效率的利用。根據報導，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^[3]，而根據我們查到的文獻資料，目前國際流行的澱粉質產品製造乙醇技術分為三類：一是使用玉米或者小麥等糧食作物；二是用紅薯、木薯、甜高粱等非主糧等；第三類則是農作物秸稈、林業加工廢料、甘蔗渣及城市垃圾中所含的廢棄物生產，統稱為纖維素^[4]。

三種技術中，最為成熟的是玉米或小麥技術，歐美特別是巴西和美國已經有大規模的製造基地。僅僅美國一地，使用玉米作為其乙醇產品的總量，現已達到了美國當地玉米總產量的18%，也因此我國進口玉米價格大幅揚升，造成養豬戶不小的成本壓力與經濟負擔。

反觀我國，目前除了經濟部能源局^[5]、中研院外^[6]，行政院原子能委員會^[7]也都投入開發生質能源的行列。其中，國內生質酒精技術

現況，已經開發出糖質轉化、澱粉轉化的技術(表一)，但纖維素轉化的技術仍無量產經驗，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^[6]

技術名稱	料源開發	量產技術	總成本 (元/公升)	綜合評價
糖質轉化	甘蔗與甜高粱 種植、採收技術	台糖	27.4 [#]	<ul style="list-style-type: none"> ■ 生產成本過高 ■ 國內尚有離廠政策
澱粉轉化	甘藷種植、 機械採收技術	酒廠	20.5 [*]	<ul style="list-style-type: none"> ■ 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	-	<ul style="list-style-type: none"> ■ 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研議”，舍休耕補助45000元/公頃。
[#] 台糖公司，2006/09/07

國中時我曾經做過利用酵母菌將葡萄糖分解成酒精的實驗，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。

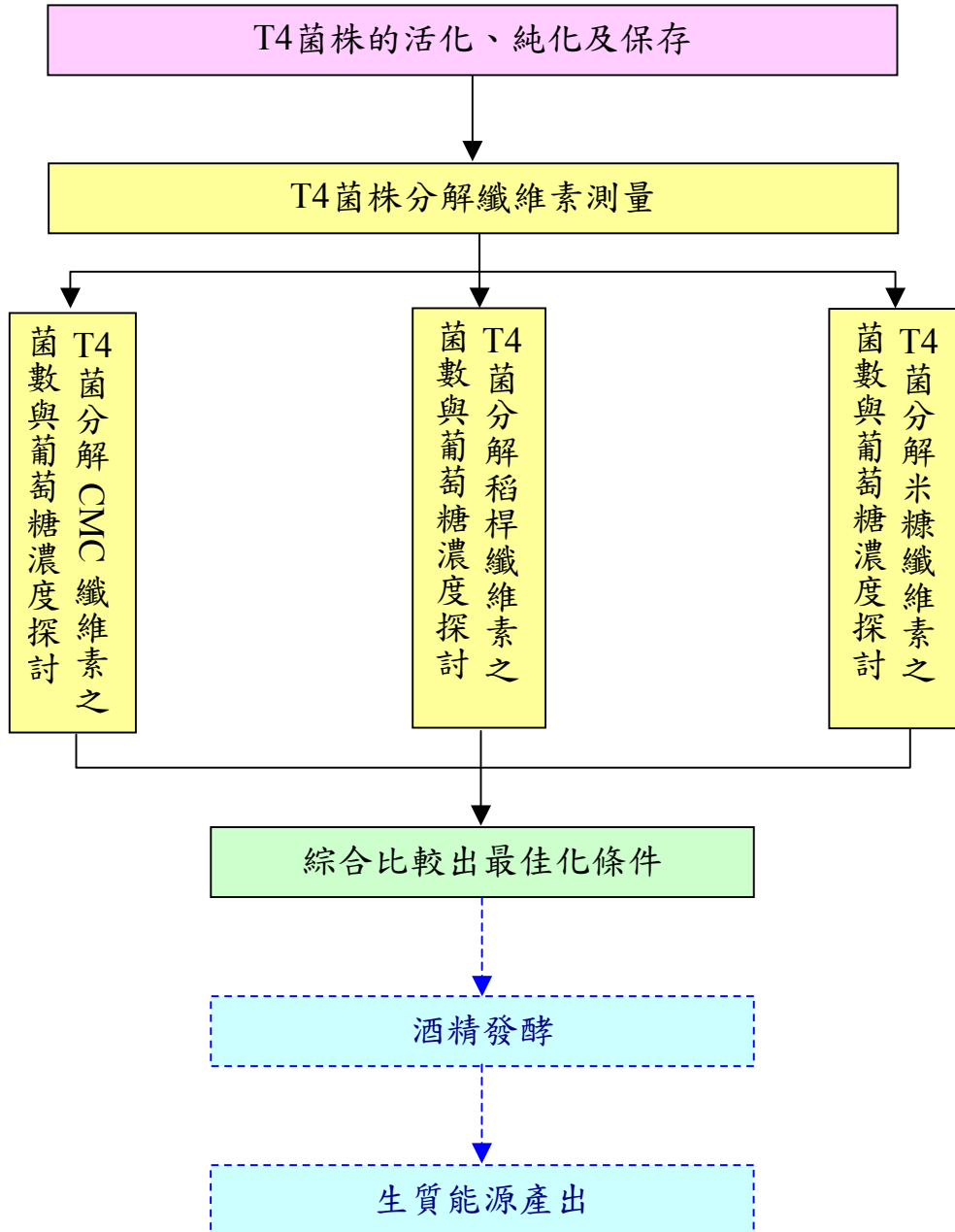
貳、研究目的與架構

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。再進一步探討酵母菌是否能將產生的葡萄糖轉化為酒精。

根據上述研究目的，本研究分別探討下列問題：

1. 菌種的活化、純化及保存。
2. T4 菌分解 CMC 纖維素之菌數與葡萄糖濃度的探討。
3. T4 菌分解稻桿纖維素之菌數與葡萄糖濃度的探討。
4. T4 菌分解米糠纖維素之菌數與葡萄糖濃度的探討。
5. 綜合比較 T4 菌於不同培養基之菌數生長與葡萄糖產量。
6. 取出產量最多、效率最高的葡萄糖進行酒精發酵，以製備生質能源。

實驗架構



——：已達成部分
- - - -：未達成部分

參、文獻探討

3.1 纖維素

植物細胞壁由纖維素、半纖維素、木質素及蛋白質所構成（圖3-1），約佔植物體90%的乾重，其中纖維素（Cellulose）構成植物細胞壁的最主要成分，每年纖維素的生成量約為 4×10^7 公噸（Singhand Hayashi, 1995），而且是自然界中含量最多的聚合物，由大約100~10,000個葡萄糖分子，形成一種分子量相當大之 β -1,4聚葡萄糖，此巨大分子由氫鍵結合在一起，形成高度有次序的結構性微纖維（圖3-2），並因為鏈與鏈之間分子間氫鍵之作用緊密堆疊形成結晶狀，僅有部份微生物如真菌、細菌、放線菌或原生動物能將之分解與利用，具有不易溶於水及不易被大多數生物利用之特性，相較於同樣由 α -1,4聚葡萄糖構成，功能為儲存的澱粉，纖維素扮演特有穩定的結構性角色，此一特性不但延續自然界食物鏈之進行，亦減低廢棄物的累積與促進農作物循環生長。

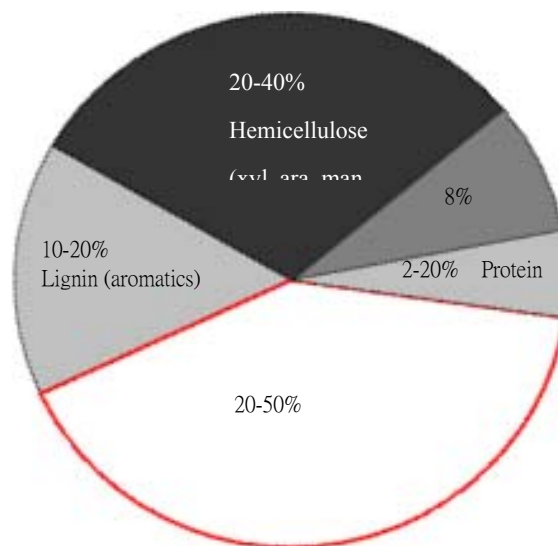


圖3-1 植物細胞壁的組成成分

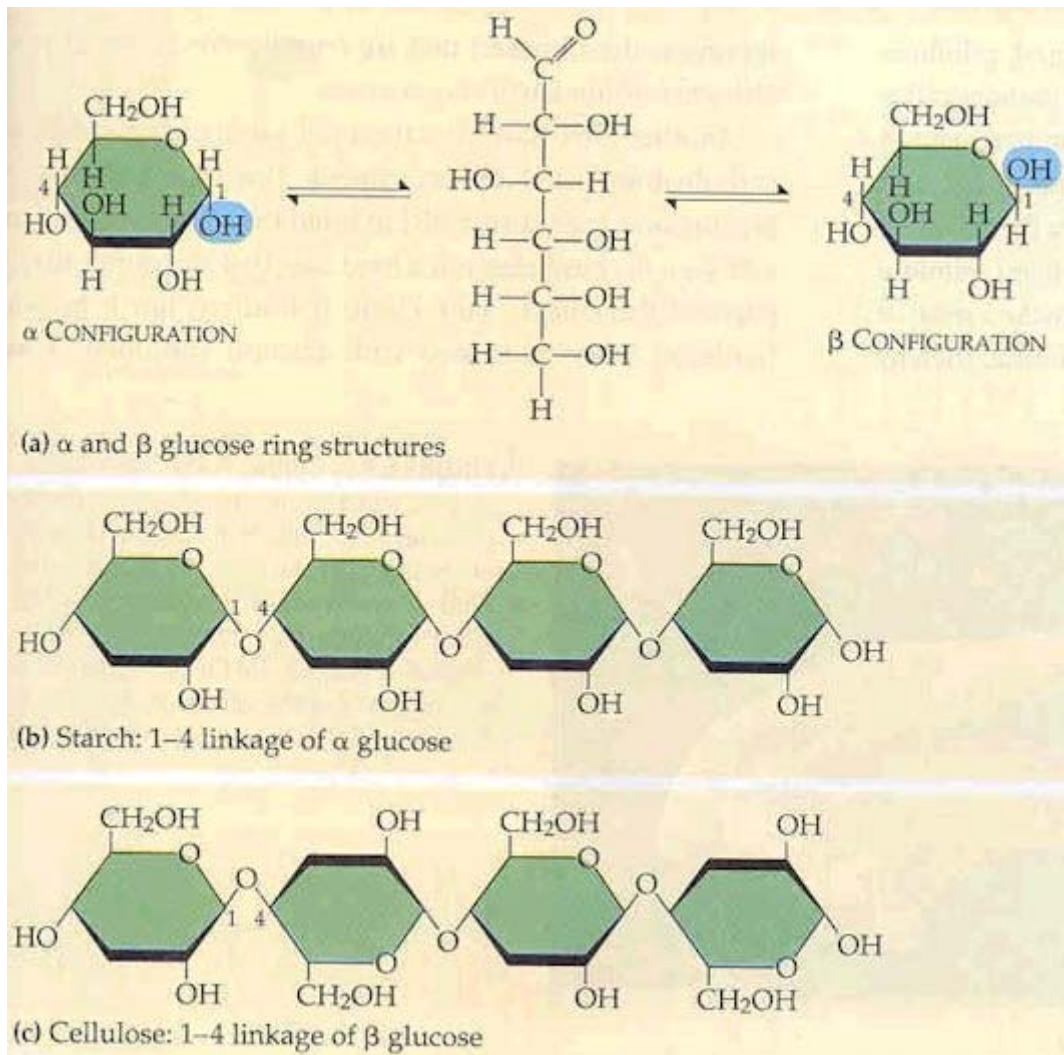


圖3-2 (a) α -葡萄糖與 β -葡萄糖之環狀結構
 (b)澱粉的結構： α -1,4聚葡萄糖
 (c)纖維素的結構： β -1,4聚葡萄糖

纖維素與半纖維素是地球蘊藏量最豐富的多醣類，但此類物質卻往往未被善加利用，而在不知不覺中任其腐壞消失。

纖維素是以葡萄糖為主要的組成單位，利用 β -1,4-glucosidation 結合葡萄糖單體形成長鏈狀，而長鏈與長鏈之間則以氫鍵來結合成一面狀，最後再以面狀堆疊成高度緊密的結晶型多醣類。葡萄糖長鏈之間氫鍵形成的緊密程度可將纖維素區分為結晶區與非結晶區。當葡萄糖長鏈兩兩靠近時，如果鏈與鏈產生緊密的氫鍵，形成一段長而且穩定的區域，便稱之為結晶區；反之，若形成的氫鍵不夠緊密，甚至

產生空洞狀的區域，便稱之為非結晶區(圖3-3)。因為纖維素具有非常穩定的結構，所以通常並無法直接被一般動物消化吸收，必須藉由一些微生物將之初步分解才能被動物所利用^[8]。

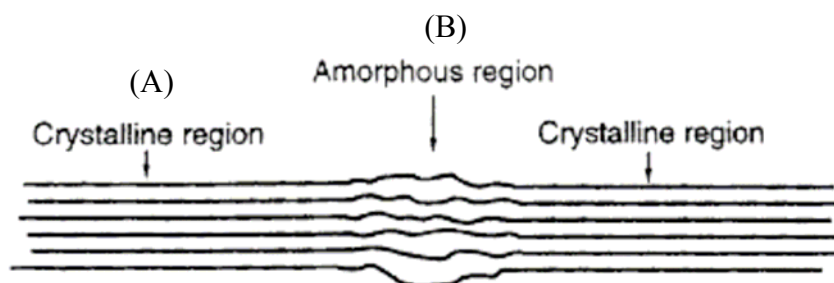


圖3-3 纖維素的(A)結晶區與(B)非結晶區

半纖維素是自然界當中蘊藏量僅次於纖維素的多醣類，它是植物細胞壁組織中，不屬於纖維素的一種多醣類。半纖維素由許多種不同的單醣所組成的無結晶型異質多醣類 (heteropolysaccharides)，其中又以木聚醣為最主要。木聚醣是由D-xylopyranose 以 β -1,4 鍵結形成的長鏈為主要結構，並在主鏈上具有其他物質如：O-acetyl、 α -L-arabinofuranosyl、 α -1,2-glucuronic acid 或 O-methylglucuronic acid 為支鏈的多醣類，其主要結構如下圖3-4所示。

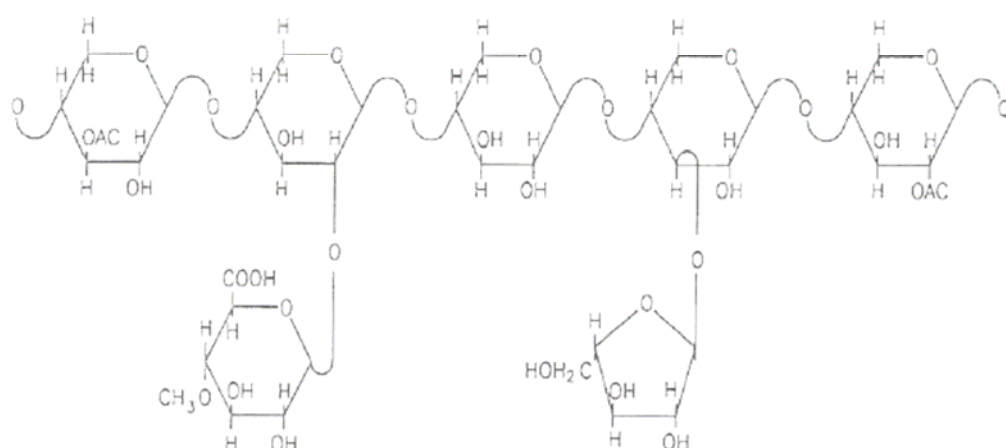


圖3-4 木聚醣之結構

3.2 *Geobacillus* 菌屬介紹^[1]

Bacillus 這屬細菌特性是好氧的、桿狀的、Gram positive、有內孢子形成。這屬細菌包含了嗜高溫菌、嗜冷菌、嗜酸菌、嗜鹼菌、淡水菌和嗜鹽菌等。*Bacillus* 這屬的16S rRNA 基因序列比對表現出相當高的系統發生的異質性，因此在分類學上有相當大的爭議。近年來許多這屬的菌種被分類學家另立門戶。

而*Geobacillus* 屬，原屬於*Bacillus* 這屬中的第五群組，為嗜高溫、好氧性和會產生內孢子的細菌，它們彼此之間所表現出的特性和16S rRNA 基因序列比較都有相當高的一致性。這些細菌通常為單一個體或排列成短鏈，有些可藉由鞭毛來移動，有的則不會移動。細胞壁的構造為Gram positive，但 Gram 染色時常處於positive 和negative 之間，橢狀或圓柱狀的內孢子常位在細菌的terminal 和subterminal 位置。細菌菌落外觀是多變的。在呼吸代謝上，氧是電子傳遞鏈的最終接受者；但有些菌是用硝酸鹽來代替氧，而呈現厭氧呼吸的代謝形式。此屬的所有菌種均為絕對嗜高溫菌，其可生長溫度範圍介於37-75°C，最適生長溫度為55-65°C。在酸鹼度的愛好上，他們屬中性菌，因為可生長pH 值範圍是6.0-8.5，最適生長pH值為6.2-7.5。在生長營養條件方面；有很多菌種不需要維生素、氯化鈉和氯化鉀。glucose、fructose、maltose、mannose 和sucrose 可被利用，但只產酸不產氣。代謝lactose 時不會產生氣體，會自己合成catalase。在氨基酸利用方面，phenylalanine 不會去氨基，tyrosine 不會被分解，不會生產indole，而且Voges-Proskauer 測試為負反應。細胞脂肪酸(cellular fatty acid) 組成方面iso-15:0、iso-16:0 和iso-17:0約佔了60%以上 (Nazine, 2001)。

3.3 農業纖維廢棄物

根據調查，台灣每年產生的農產廢棄物總量約為2,300 萬公噸，大致有下列幾種：(一)穀類廢棄物(二)特用作物廢棄物(三)蔬果廢棄物(四)食品工廠廢棄物(五)菇類栽培介質廢棄物(六)禽畜及養殖廢棄物(七)樹皮、庭園及行道樹修剪之廢棄物，針對本研究對象，僅介紹穀類廢棄物中的稻草、稻殼(粗糠)與玉米穗軸：

在本省，穀類廢棄物包括稻草、稻殼及雜糧作物廢棄物如落花生藤蔓、落花生殼、玉米穗軸、甘藷藤及大豆藤蔓等，穀類廢棄物之用途有直接利用，諸如撒布於耕地防止壤沖刷並供給養分，或作為禽畜之粗飼料，亦可經由化學藥劑，酵素及生化方法處理將穀類中所含木質素、纖維素及半纖維素分離做進一步利用或者是作為熱能利用如直接燃燒等，以節省殘留廢棄物之搬運費用。

(1) 稻草廢棄物之處理

據台灣農業年報(民國八十六年版)之資料，八十五年度種稻面積有 391,457 公頃，而據估計每公頃稻草產量約 6 公噸，故台灣每年稻草產量約有 235 萬公噸。

稻草一般成份為有機物大於 95%，其中碳 41.3%，氮 0.81%，半纖維素 20.6%，纖維素 24.7%，木質素 7.7%。目前處理方法一般有製做草繩、草袋、草蓆、紙板，畦面敷蓋材料，充當燃料，或混合其他資材做成堆廐肥；也可直接掩埋土中，循環利用其養分或就地燃燒成灰。由於目前工資昂貴，因此利用稻草做燃料，飼料、草袋、草蓆等相當少，大部份均採就地燃燒與直接掩埋，焚燒雖可殺死病蟲害，但亦造成空氣污染產生濃煙甚而引起交通事故，且燃燒也會造成有機物、氮素及部份磷的損失。台灣在民國七十九年三月已立法禁止焚燒

稻草。直接掩埋可當作基肥，改善土壤物理、化學及生物性之效果。此外稻草收割後晒乾運到外銷工廠裁成適當長度，以機器壓實打包或在田裡用機器直接打包，外銷日本做榻榻米或銷往歐美地區做為養馬乾草用。目前目前大陸北京膜料學科學技術應用研究所已在研發此種新型敷蓋膜，解決部份農地污染。

(2) 稻殼廢棄物處理

稻殼俗稱粗糠，為碾米工廠穀粒加工生產之副產物，本省每年之稻殼廢棄物約有 60 萬公噸。一般碾米廠或農會大都採取露天燃燒或傾倒在河川空地的方式處理，造成環境污染。過去稻殼為主要的農家燃料，由於稻殼質硬疏鬆，且矽含量豐富，因此若能直接再施用於耕地，經分解腐爛後，可提供大量有效矽、鉀，供水稻生長利用。目前稻殼僅有少量作為飼料及建築材料之填充料，極少部份做為果園、花卉及蔬菜之畦面敷蓋。目前偶亦可見鄉村飲食店利用稻殼做為燃料進行烹調，以減少炒菜時之油煙。根據工研院的研究指出，稻殼是一種廉價的燃料，含水量低，每公斤燃燒後可產生 3,600 卡的能量，為省產煙煤的 60%，燃燒後所產生的酸性腐蝕氣體又非常少，是一種很好的燃料，就資源回收的觀點來看，稻殼灰中 90% 以上為二氧化矽成分，經過加工後可做為高經濟價值的耐火及保溫材料。若將國內全年產生的稻殼拿來做燃料，每年可節省五億元的燃料費，而將稻殼灰外銷日本做隔熱材料，每年也會有五千四百萬元的產值。

(3) 玉米蒿、玉米穗軸及玉米筍鬚

玉米蒿為玉米穗經割取後所殘餘之新鮮玉米莖葉以及部份未成熟之玉米穗。台灣農家種植玉米所生產之玉米蒿，除少部份供自家牲畜作為飼料外，大部份均遭棄置於田間翻入土壤中充作基肥。往年玉米穗軸年產量達 20 萬噸，玉米穗軸可做為燃料、堆肥栽培用介質，

亦可製造煙斗等。又玉米穗軸磨成粉後可做為育苗鉢進行蔬菜及花卉之育苗。近年來，由於在田間採用機械採收打粒，故玉米穗軸已大為減少。又甜玉米之玉米筍採收後，其外包葉及鬚，晒乾後可做為養牛芻料用。

肆、材料與方法

一、菌種來源：

菌株 *Geobacillus thermoleovorans* T4購自 BCRC 生物資源保存及研究中心。

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，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 (Mandels and Reese, 1957)

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

2. 稻稈、玉米秸、米糠培養基

分別將取得的稻稈、玉米秸及米糠，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、玉米秸及米糠培養基，以高溫高壓滅菌後即可作為實驗之用。

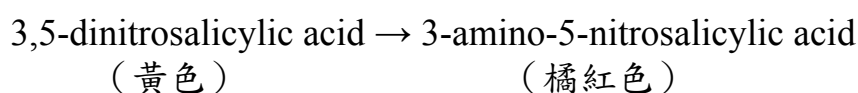
3. 營養瓊脂培養基 (Nutrient Broth, NB)

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。

三、試劑

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 試劑之反應，是利用 DNS 具還原力(reduction)之特性，因此碳水化合物只要具有 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 H₂O) 至 100 mL。

四、菌株的培養方法：

1. 液態培養

取菌株 *G. thermoleovorans* T4 種入含有 3 mL 的NB小試管中，在60°C下培養 48 小時，作為種菌。取試管中菌液 1 mL 轉

種於含有 NB 150 mL 的錐形瓶中，培養 48 小時，做第一次子代培養。將第一次子代培養的菌液，取出 1 mL 滴入另一瓶新的 NB 150 mL 的錐形瓶中，在 60°C 下，震盪 160 rpm，培養 48 小時，作為第二次子代培養。將第二次子代培養的菌液，取出 1 mL 滴入另一瓶新的 NB 150 mL 的錐形瓶中，在 60°C 下，震盪 160 rpm，培養 48 小時，定時取樣。

2. 菌株的保存

將 *Geobacillus thermoleovorans* T4 菌體種於 Nutrient Broth agar (NA; 1.5% agar) 做四區劃位，在 50°C 培養 12 小時，確認無污染後，將第四區的單一純化菌落取樣培養於 NB，以分光光度計讀取 600 nm 的吸光值 (optical density, OD₆₀₀)，直到約為 1.0 時，取 0.45 mL 菌液加入 0.15 mL 的甘油，混合均勻放置於 -80°C 下長期保存。

3. 總生菌數的測定

在測各菌總生菌數時，取 1 mL 的菌液 (若濃度太高，可用滅過菌的水進行稀釋)，滴在血球計數器上，於光學顯微鏡下觀察，計算 T4 菌每 2 小時的總菌數目，連續測 12 小時。另外，吸取 1 mL 的菌液放入離心管中，靜置 20 分鐘以沈澱纖維粉末，利用分光光度計測量其吸光值 (OD₆₀₀)，與血球計數器之結果做比較，即可推算出總生菌數。

五、酵素活性測定

1. 胞外粗酵素液的萃取

取 0.6 mL (菌數約 5×10^8 個/mL) 的菌液，在 8000g 離心 10 分鐘，取 0.5 mL 上清液作纖維素分解酵素活性的測定。

2. 內切型纖維素纖維分解酵素 (CMCase) 活性之測定

取0.5 mL 粗酵素液，加入0.5 mL 的反應溶液（1% CMC、玉米秸、稻稈、糠米殼溶於0.1 M，pH 7.0 之 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 磷酸鹽緩衝溶液）於100°C 下水浴反應10分鐘後。以 DNS 法測定還原糖的含量。

3. DNS 還原糖的測定(Miller, 1959)

取反應液1 mL（0.5 mL 粗酵素液及0.5 mL 基質溶液於50°C 水浴1小時），加入1 mL 的DNS 試劑，混合後在沸水浴中加熱反應5分鐘，加入3 mL 的蒸餾水稀釋，混合均勻後退溫至室溫，讀取550 nm的吸光值（ OD_{550} ）。

對照組為0.5 mL 粗酵素液及0.5 mL 基質溶液，加入1 mL DNS試劑混合後於上述相同反應條件下處理。反應組測得之還原糖量減去對照組的還原糖量，所得的差值為酵素反應所釋放的還原糖量。

所得的吸光值利用葡萄糖標準曲線轉換成相當的還原糖量。葡萄糖（glucose）標準曲線作法為取0.1~1.0 mole/mL 的葡萄糖溶液1mL，加入1 mL DNS 試劑在上述條件下測吸光值，畫出標準曲線。

伍、結果與討論

(一) 菌種活化、純化及保存

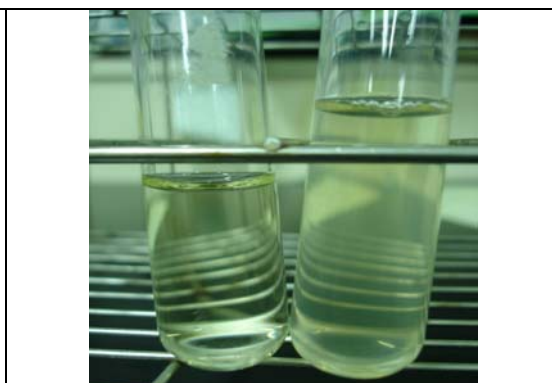
將自 BCRC 買來的 *G. thermoleovorans* T4 菌種放入 NB 培養液中進行活化，經過 16 小時，將菌液取出，重複上述動作三次後，即完成活化，開始進行純化。

純化的步驟需利用接種環將菌體由 NB 中取出，並放入 NA 中作四區劃位的動作，12 小時後便有生長現象，再從第四區取樣出純化完成的單一菌落，放入 NB 開始大量培養。

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 -80°C 冰庫中保存即完成。



將購買 T4 菌種於
無菌操作台上取出



活化後的 T4 菌
(左為一次活化，右為二次活化)



經過四天後生長的 T4 菌體



將 T4 菌體放入離心管中保存



大量培養在 NB 中的 T4 菌

顯微鏡下的 T4 菌(1000x)

(二) T4 菌分解 CMC 纖維素之菌數與葡萄糖濃度的探討

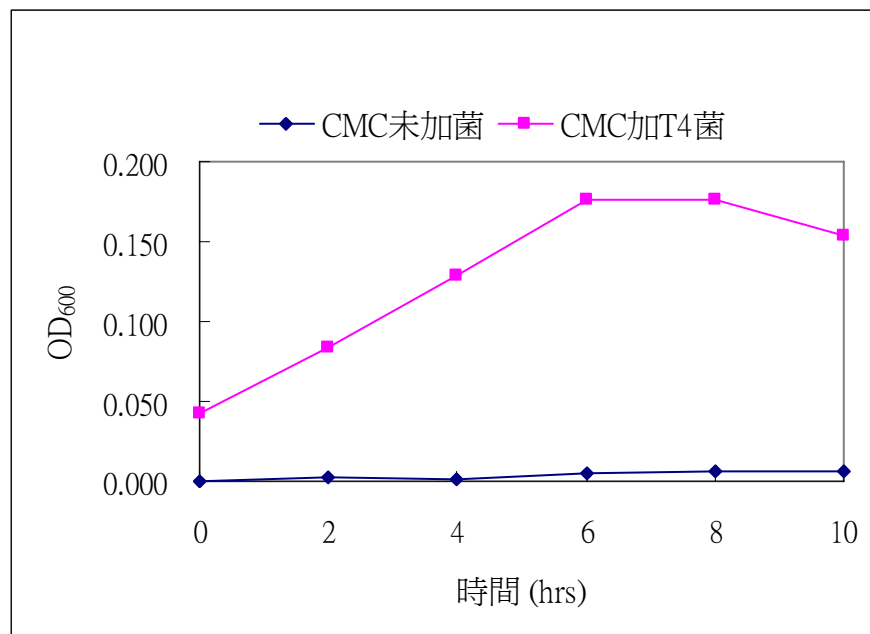


圖 2-1 CMC 培養基加不加菌之菌數吸光值對照圖

在 CMC 培養基中加入 T4 菌之後，利用測量吸光值的方法探討此菌是否能生長繁殖；由圖 2-1 中發現，無菌的 CMC 培養基，其菌數吸光值隨時間增加維持穩定值，而加菌的 CMC 培養基，其菌數吸光值隨時間增加有上升的趨勢，在 6 小時之後達到最大值並且維持穩定狀態。此結果表示在 CMC 培養基中，T4 菌可生長繁殖，而其生長繁殖在 6 小時之後可能因為細菌生長速度與死亡速度達到平衡，因此

數目不再增加。

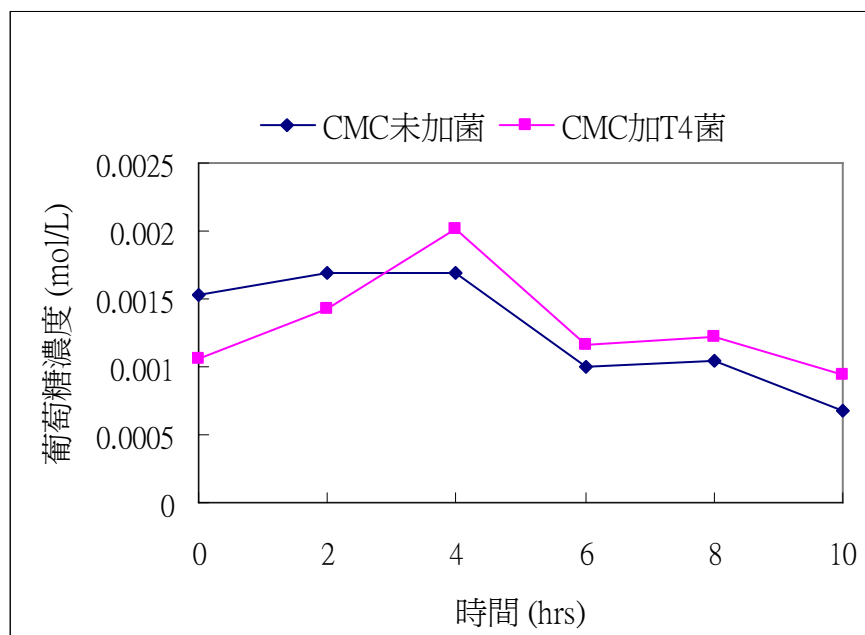


圖 2-2 CMC 培養基加不加菌之葡萄糖濃度對照圖

在 CMC 培養基中加入 T4 菌之後，測量葡萄糖濃度以探討細菌是否能將 CMC 纖維素分解為葡萄糖，由圖 2-2 中發現，無菌及有菌的 CMC 培養基，其葡萄糖濃度值的起伏趨勢相近，而有菌的 CMC 培養之葡萄糖濃度於 4 個小時之後皆高於無菌的 CMC 培養基。此結果表示本研究所培養之 T4 菌可分解 CMC 培養基的纖維素為葡萄糖，與戴等人（民 93）所發表的論文中結果相符合。

(三) T4 菌分解稻桿纖維素之菌數與葡萄糖濃度的探討

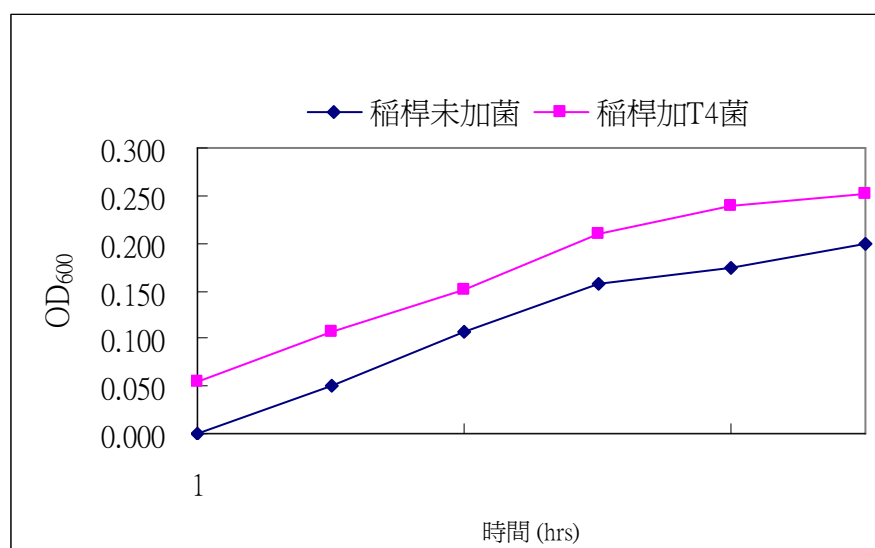


圖 3-1 稻桿培養基加不加菌之菌數吸光值對照圖

在稻桿培養基中加入 T4 菌之後，利用測量吸光值的方法探討此菌是否能生長繁殖，由圖 3-1 中發現，無菌與有菌的稻桿培養基之菌數吸光值趨勢相似，皆隨時間變化有上升的趨勢，唯加菌後的稻桿培養基吸光值皆高於未加菌的吸光值，到達 8 小時之後呈現穩定的狀態。由結果說明在稻桿培養基中，T4 菌可生長繁殖，但可能因為纖維粉末懸浮粒子的影響，造成無菌的培養基吸光值受到影響而有升高的不穩定現象。

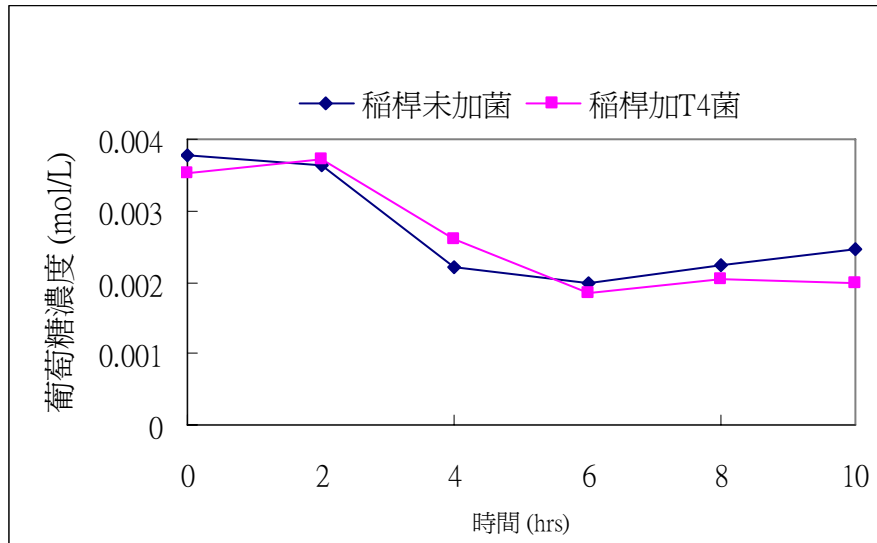
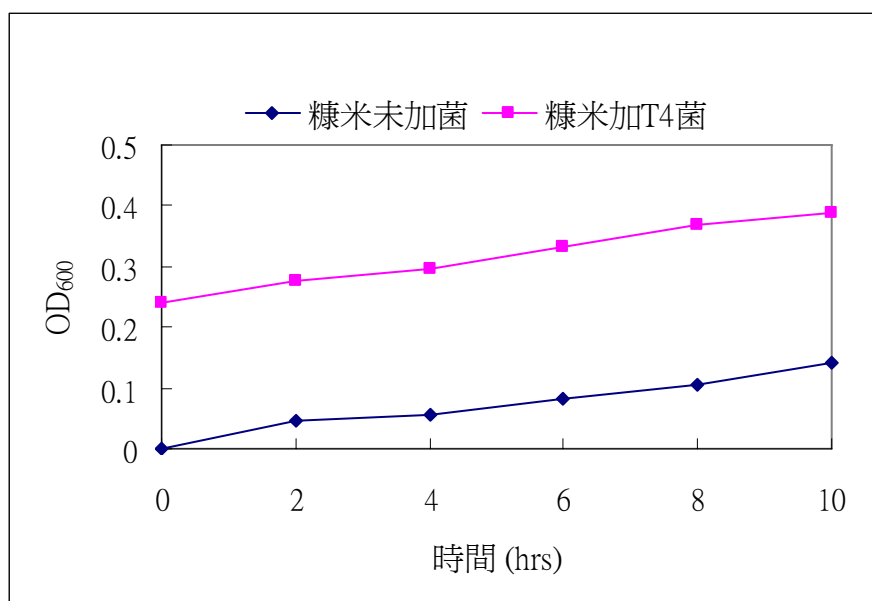


圖 3-2 稻桿培養基加不加菌之葡萄糖濃度對照圖

在稻桿培養基中加入 T4 菌之後，測量葡萄糖濃度以探討細菌是否能將稻桿纖維素分解為葡萄糖，由圖 3-2 中發現，無菌以及有菌的稻桿培養基，其葡萄糖濃度的數值皆相似。由此結果得知，T4 菌分解稻桿纖維素的效果較差，濃度值上下起伏的狀況，推測同樣也是因為溶液粉末懸浮粒子干擾所致。

(四) T4 菌分解米糠纖維素之菌數與葡萄糖濃度的探討



4-1 米糠培養基加不加菌之菌數吸光值對照圖

在米糠培養基中加入 T4 菌之後，利用測量吸光值的方法探討此菌是否能生長繁殖，由圖 4-1 中發現，無菌稻桿培養基的吸光值有輕微的起伏，而加入 T4 菌之培養基的吸光值皆高於未加菌的吸光值，由此可知 T4 菌可在米糠培養基生長並且增生，另外，可能因為纖維粉末懸浮粒子的影響，造成無菌的培養基吸光值有升高的不穩定現象。

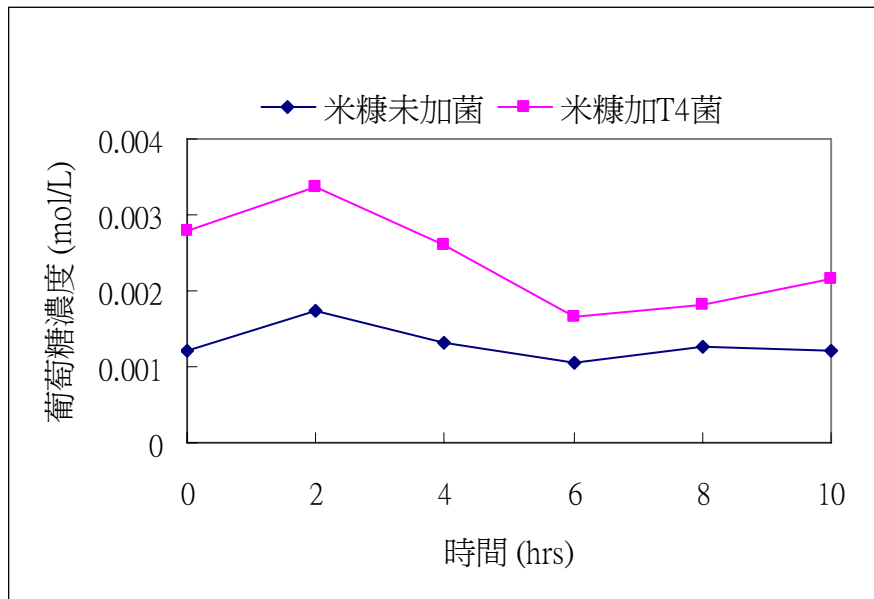
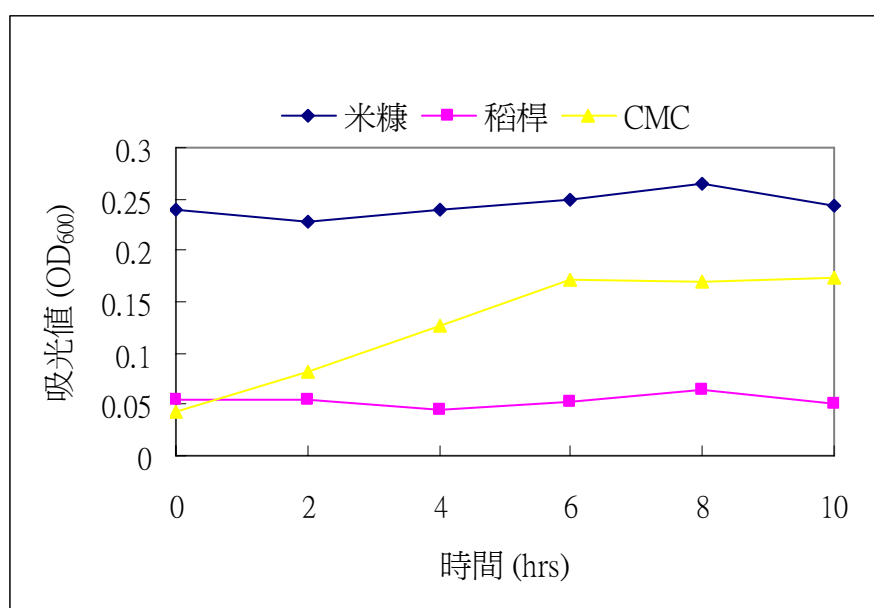


圖 4-2 米糠培養基加不加菌之葡萄糖濃度對照圖

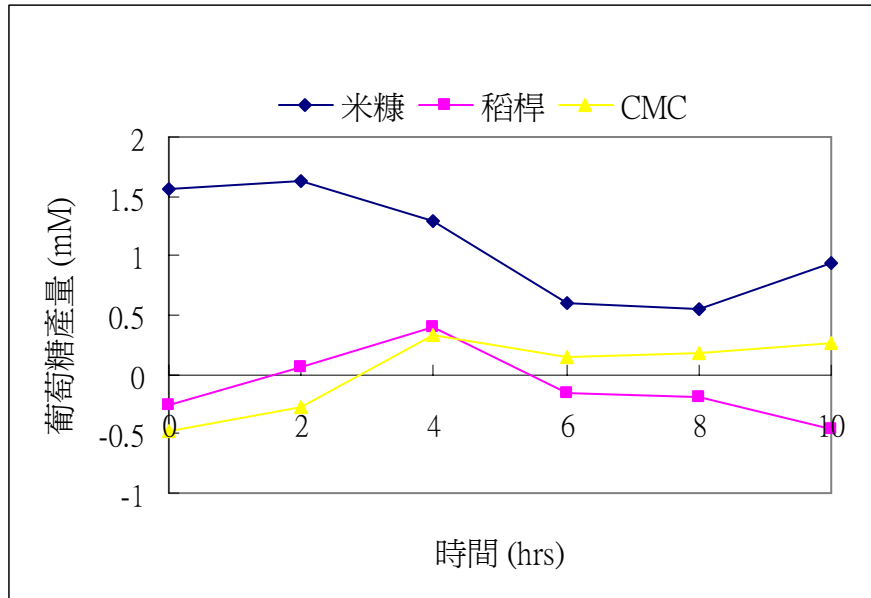
在米糠培養基中加入 T4 菌之後，測量葡萄糖濃度以探討細菌是否能將稻桿纖維素分解為葡萄糖，由圖 4-2 中發現，無菌的米糠培養基葡萄糖濃度隨時間呈現穩定狀態，而加菌的米糠培養基葡萄糖濃度皆比無菌培養基高，表示 T4 菌可分解米糠纖維素為葡萄糖。

(五) T4 菌於不同培養基之菌數生長與葡萄糖產量比較



5-1 T4 菌於不同培養基中之生長比較圖

將有菌與無菌培養基的菌數吸光值相減以代表細菌生長繁殖的狀況，比較 T4 菌分別加入 CMC、稻桿以及米糠培養基中細菌生長的狀況，結果發現（圖 5-1）T4 菌皆可在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（平均吸光值 0.171），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（平均吸光值 0.065），在米糠培養基中生長的最好，在培養後 8 小時數量達到最高峰（平均吸光值 0.264），可知在 60°C 的培養下，T4 菌可在米糠培養基中生長得最好，且數量在培養後 8 小時達到高峰。



5-2 T4 菌於不同培養基中葡萄糖產量比較圖

由於 T4 菌具有纖維酵素活性，可分解 CMC 纖維素為葡萄糖 (2003, 尤等人)，經由測量還原糖的結果，我們將有菌與無菌培養基的葡萄糖濃度相減以代表葡萄糖產量，結果發現 (圖 5-2) T4 菌與 CMC 培養基作用約 4 個小時達到最大葡萄糖產量 (平均葡萄糖產量 0.335 mM)；與稻桿培養基作用約 4 小時之後產生最多葡萄糖 (平均葡萄糖產量 0.393 mM)，而米糠培養基在作用約 2 小時即有最大葡萄糖產量 (平均葡萄糖產量 1.622 mM)，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葡萄糖的能力，尤其在米糠培養基中葡萄糖的產量最大也最快。

此外，比較圖 5-1 與圖 5-2 的結果，可發現當在不同培養基中，當細菌數量逐漸增加時，葡萄糖產量卻有下降的趨勢，推測細菌大量繁殖後，可能會因為養分的不足而大量利用其分解所得的葡萄糖作為養分的來源，導致葡萄糖濃度下降。

陸、結論

由本實驗結果可知，在 60°C 的環境中，T4 菌可在 CMC、稻桿以及米糠培養基中生長繁殖且發揮其分解纖維素為葡萄糖的能力，尤其在米糠培養基中生長的狀況最好，且在作用將近 2 個小時即可獲得最大產量的葡萄糖。

目前已針對 1.622mM 的葡萄糖進行發酵作用的初步實驗，令人振奮的是確定有酒精的產生，未來我們將更仔細地進行發酵的實驗並且進一步的純化出生質酒精，相信未來我們很快就能化腐朽為神奇，從米糠的纖維培養基中，製造出第一批純化的生質酒精，為台灣的能源再生創造一線曙光！

柒、參考資料

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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.com/swcl2006/2007-07/03/content_10465481.htm。
5. 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>
6. 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%9D%9C%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%BE%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%9D%9C%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%BE%E5%B1%95%E6%9C%9B(%E8%91%A3%E5%95%9F%E5%8A%9F).pdf)
7. 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>
8. 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，
台北。

評語

本作品以 *Geobacillus thermoleovorans* T4 嗜高溫好氧菌，嚐試將羧甲基纖維素(CMC)、稻桿、玉米秸分解為葡萄糖以發展生質酒精，探討作用時間、細菌濃度等最佳操作條件，目前所呈現之實驗結果多為初步之試驗，尚有進一步研究發展的空間。