2009 年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

編號： **120016**

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

得獎獎項

環境科學科大會獎第三名

學校名稱： 國立高雄師範大學附屬高級中學

作者姓名： 鄭丞舜　陳子雄

指導老師： 曾鶯芳　吳季瑾

關 鍵 字： 纖維素 、 纖維素分解菌 、 **T4** 菌株

作者簡介

常問自己：「做個科學人，能夠得到的有甚麼？」是專業的能力嗎？還是沉浸於掌聲中的成就？對我來說，是對實驗永不放棄的熱情；充滿求知慾的心；還有實驗過程中所學到的點點滴滴。而在國中時期更因參加有關科展的相關比賽對實驗更有近一步的了解以及認識，在這不間斷的過程中，體會到相當多的事情，這使我成長並開拓自己的視野。我是鄭丞舜，是個想要為自己撰寫歷史的人。

我叫陳子雄，我不敢自稱是個科學家，但我敢說自己是個熱愛科學的人。經過 08 年的國科、中專計畫的洗禮，我得到許多教授的指導，實驗也有很大的進展，學習到很多的東西。我熱愛科學，就像一位球員熱愛打球一樣，她帶給我許多驚奇，不論是生活週遭、不論是各領域的科技，都令我興奮、愉悅。這次的國科，我又來了，我帶著我的作品來與大家分享，希望這次我又能有很大的收穫。

摘要

嗜高溫好氧菌*Geobacillus thermoleovorans* T4，是最先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，成功地獲得二階段重要結果：第一階段確定還原醣產率稻桿在4 hrs有9.31%，稻穀殼在2 hrs有21.5%，玉米秸則不理想；以CMC培養基調整氮碳比後，發現的還原醣產率可大幅提升至有26.89%（N/C=1：9）；植入菌株前以蒸煮處理，稻桿與稻穀殼的還原醣產率提高為37.41%（N/C=1:9）與51.66% (N/C=1:7)；最後，針對稻穀殼發現在pH=6、65℃時，還原醣產率可高達69.81%。第二階段將稻穀殼在最佳條件下以T4菌株反應後之溶液，植入30mL的*Saccharomyces diastaticus*酵母菌反應72小時後，酒精發酵率可高達79.89%；換言之，本研究可將廢棄纖維素轉換為生質酒精的產率已達28%以上。圖1.為自製生質酒精反應器，初步有不錯的轉化效果。

圖1　農業廢棄纖維素轉化為生質酒精之自製反應器

Abstract

The hyperthermophilic aerobic strain *Geobacillus thermolovorans* T4 is the first to be reported that the strain has the ability of cellulose hydrolyzation. But it's only used in the phase of academic research. This research regards CMC as the group of contrast in experiment and succeeds in acquiring the important result of two phases. In the first phase, the experiment shows that the reducing sugar yield ratio of rice straw medium in 4 hours is 9.31%, and the one of the rice hull medium in 2 hours is 21.5%. But the corn leaf sheath medium doesn't have good result. Furthermore, we adjust the N/C ratio of medium. And the reducing sugar yield ratio of CMC medium (N/C=1:9) is increasing 26.89%. reducing sugar yield ，Then we steam the cellulose before placing the strain into the medium. The reducing sugar yield ratio of rice straw medium (N/C=1:9) is increasing to 37.41% and the one of rice hull medium (N/C=1:7) is rising to 51.66%. In the final analysis, we discover when the rice hull medium is at the pH=6, 65℃ environment, the reducing sugar yield ratio can approach 69.81%. In the second phase, we take the rice hull medium in the best environment to react with T4 strain. And then we mix the solution with yeast *Saccharomyces diastaticus*, the preliminary alcohol fermentation rate is 69.42%. In other words, to turn the deserted cellulose in bioethanol of conversion rate in this research already more than 28%. Fig 1. is the homemade reactor by which we generate bioethanol. The preliminary test has good transformational result.

Figure 1. The homemade bioethanol reactor.

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

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[1]，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生物生產，統稱為纖維素[2]。

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[3]、中研院外[4]，行政院原子能委員會[5]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(如表 1 所示)，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1　國內生質酒精技術現況[4]

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#	■ 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*	■ 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

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、文獻探討

2.1　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（如圖2.1所示），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[6]，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（如圖2.2所示），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。

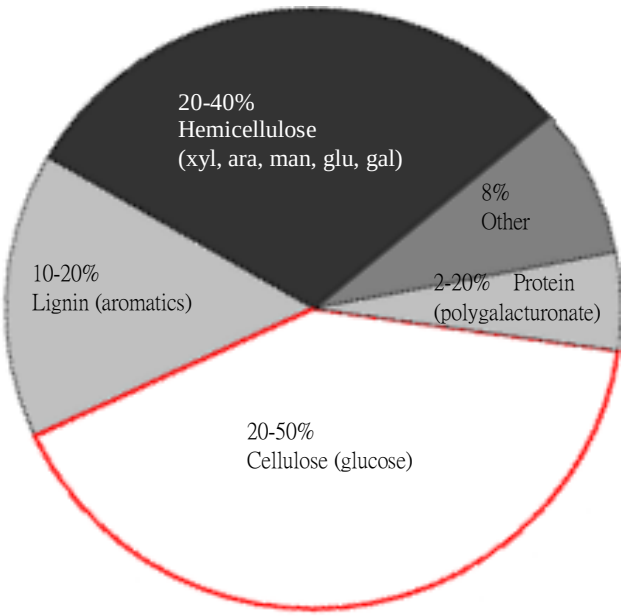


圖2.1　植物細胞壁的組成成分[23]

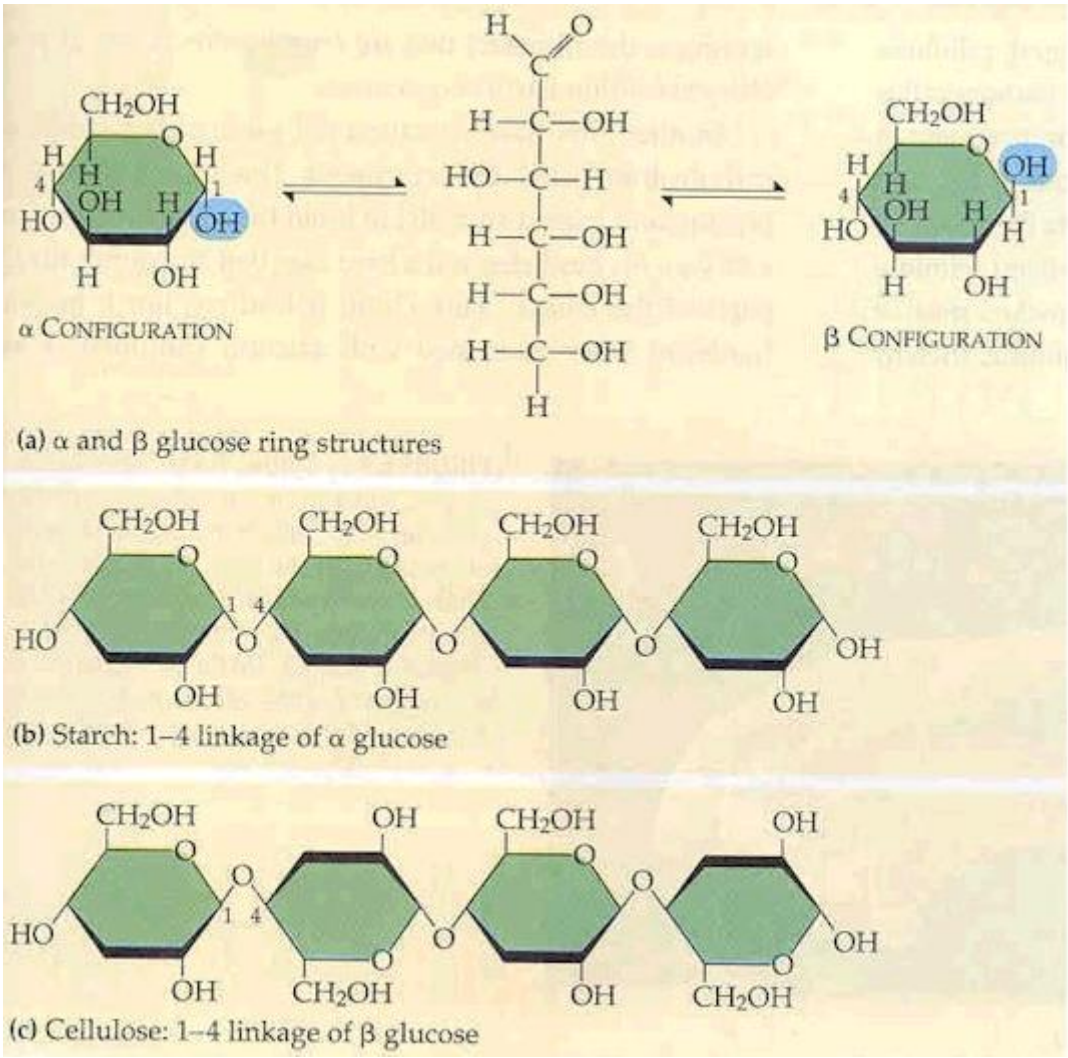


圖2.2　(a)α-葡萄糖與β-葡萄糖之環狀結構 (b)澱粉的結構：α-1,4聚葡萄糖 (c)纖維素的結構：β-1,4聚葡萄糖[7]

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糖類。葡萄糖長鏈之間氫鍵形成的緊密程度可將纖維素區分成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(如圖2.3所示)。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。

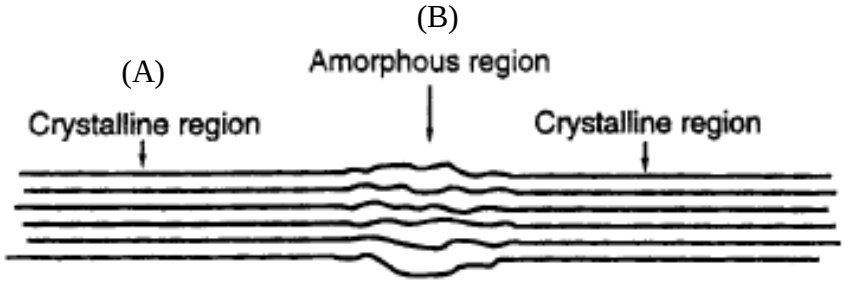


圖2.3　纖維素的(A)結晶區與(B)非結晶區[17]

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，其主要結構如圖2.4所示[8]。

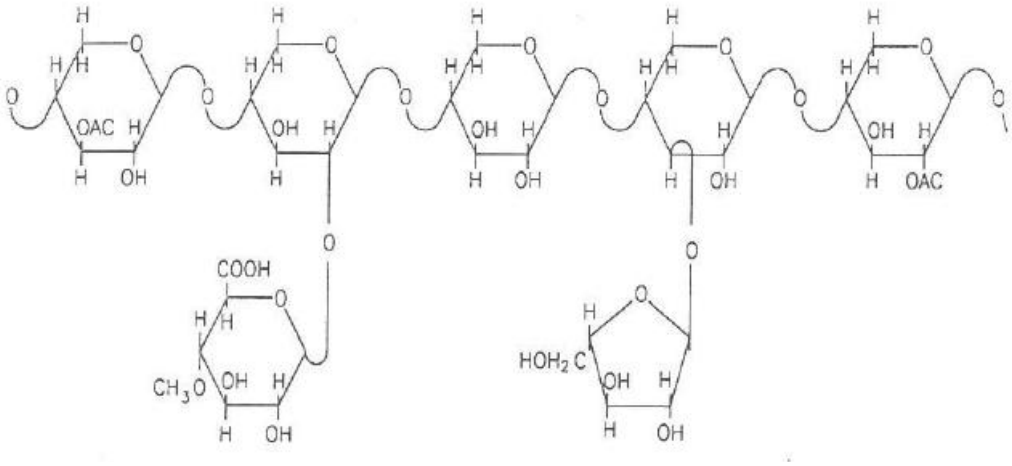


圖2.4 木聚醣之結構

2.2 纖維分解酵素介紹[9]

纖維素分解酵素是一群水解酵素（hydrolase），包括內切型纖維素分解酵素（endo-β-glucanase）、外切型纖維素分解酵素（exo-β-glucanase）和纖維二醣酵素（cellobiase）這三類主要酵素。經由這三類酵素彼此間的協同作用機制（synergy mechanism），可將不溶性的纖維素完全水解[25]。

一、內切型纖維素分解酵素（Endo-1,4-β-D-glucanase, E.C. 3.2.1.4）

又可稱為羧甲基纖維素分解酵素(carboxymethylcellulase,4 CMCase）、endoglucanase 或是 endocellulase。可任意作用於纖維素間的 β-1,4-glucosidic bonds 而將其切斷，因此，不但加速縮短了纖維聚合物的長度，而且也逐漸增加了還原醣的濃度。但此酵素的活性會受到分解後產物纖維二醣的反饋抑制。

二、外切型纖維素分解酵素（Exo-1,4-β-D-glucanase, E.C. 3.2.1.91）

又可稱為 Avicelase、cellobiohydrolase 或是 exocellulase，此酵素主要作用於纖維素的結晶形部分，可由纖維素的還原（reducing）或非還原端（non-reducing ends），以纖維二醣為一個單位來慢慢的降解；雖然降解結果也會增加還原醣的含量，但是，在纖維聚合物的長度上卻不會有太大的改變。

三、纖維二醣酵素(β-glucosidase, E.C. 3.2.1.21)

又可稱為 cellobiase，葡萄糖的產生可由此酵素降解纖維二醣和短鏈的纖維素寡醣(cellooligosaccharides)而來。因為cellobiase能降解纖維二醣，故能減低纖維二醣對內切型纖維素分解酵素或外切型纖維素分解酵素的抑制作用。

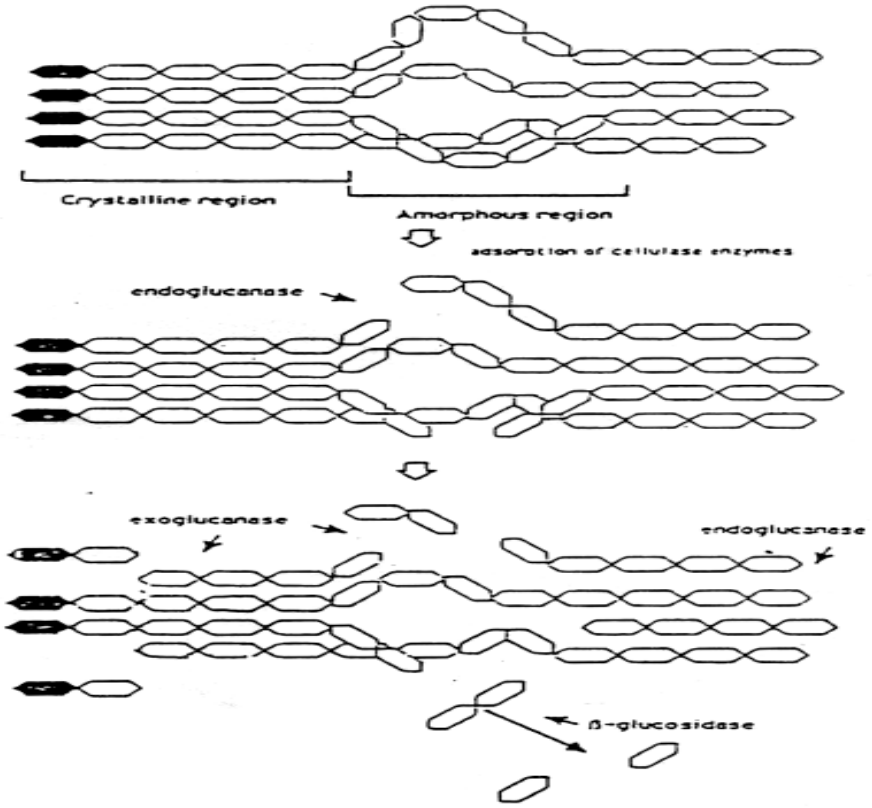


圖2.5　纖維素纖維分解酵素作用機制[17]

自然存在的纖維素，在構造上可分為排列整齊的結晶形區域（crystalline region）以及無定形區域（amorphous region），其結晶狀的程度會隨著纖維素的來源不同而有所變化，且其結晶形區域會隨著排列的型式，而對酵素的分解以及水等小分子的穿透能力有著不同程度之抵抗性[18]、[24]。因此，如何有效的利用微生物來分解含量豐富的纖維素，是一項值得研究的課題。

2.3　*Geobacillus* 菌屬介紹[9]

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℃，最適生長溫度為55-65℃。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。

2.4 *Geobacillus thermoleovorans* T4菌種 16S rDNA序列之定序分析[10]

16S rDNA sequences of strain T4（1-1454 bp）（AY074879）

GTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAGATCGGAGCTTGC
TCTGATTTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCA
ACCTGCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTA
ATACCGGATAACACCGAAGACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGG
CGGCCTTTGGCTGTCACTTGCGGATGGGCCCGCGGCGCATTAG
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAG
CCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAG
AAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGA
GCGCCGTTCGAAGAGGGCGGCGCGGTGACGGTACCTCACGAG
GAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCG
CAGGCGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACC
GTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAG
GAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG
TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGCAAC
TGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA
GAGGGGTCACACCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCGATAAGCA
CTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTG
ACAACCCAAGAGATTGGGCGTTCCCCCTTCGGGGGGACAGGG
TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATG
TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTCTAGTTG
CCAGCACGAAGGTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCGGCGACAA
GTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTA
TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGG
CTGCGAACCCGCGAGGGGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCT
CAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGA
ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTC
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGCTTGC
AACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCCGCAAGGGAGCCAGCC
GCCGAAGGTGGGGCAAGT

2.5 農業纖維廢棄物[11]

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廄肥；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栽成適當長度，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缽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。

2.6 酵母菌

1. 型態與大小：

酵母菌屬於真菌類，但與一般真菌類具有細長的菌絲不同，它只有單細胞。因酵母種類不同而不同，同一種也會因培養條件或發育時期不同而有異，一般直徑約在5 μm，顯微鏡40X及100X接物鏡下皆可觀察到。形狀有橢圓、球形、長形，一般以橢圓形較常見，在釀酒的地區，橢圓酵母菌是最重要的種類。常見的形狀如圖2.5所示[12]：

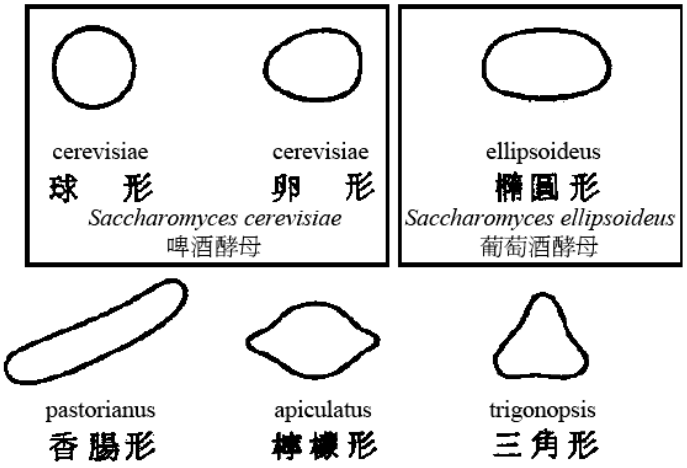


圖2.5　常見酵母菌的形狀

2. 酵母菌的構造[13]：

酵母的內部構造如圖2.6所示，細胞的最外層是很厚的細胞壁（cell wall），內部有很薄的細胞膜（cytoplasmic membrane），細胞膜內部則是充滿細胞質（cytoplasm）， 細胞質中有核（nucleus）、液泡（vacuole）、粒腺體(mitochondria)、內質網（endoplasmic reticulum）、核糖體(ribosome)、脂肪粒、肝醣粒(glycogen particle)、多聚偏磷酸(polymetaphosphate)，小體（volutin body）等存在。一般酵母菌細胞壁的厚度約有0.1~0.4μm左右，具有堅固之構造，對外界的環境具有保護細胞內部的作用，並且使細胞保持一定的形狀。菌體中細胞壁的含量會隨酵母的種類或培養時間不同而有所差異，一般佔乾燥菌體的15%左右，進入定常時期含量會急速增加。酵母細胞壁的組成以聚葡萄糖(glucan)與甘露聚糖為主，其他包含少量的葡萄糖胺(glucosamine)、蛋白質、磷及微量的脂肪。圖9為酵母細胞壁mannan 與glucan 的構造，在電子顯微鏡下細胞壁呈兩層的膜構造，外層是mannan-蛋白質複合體，內層是glucan。

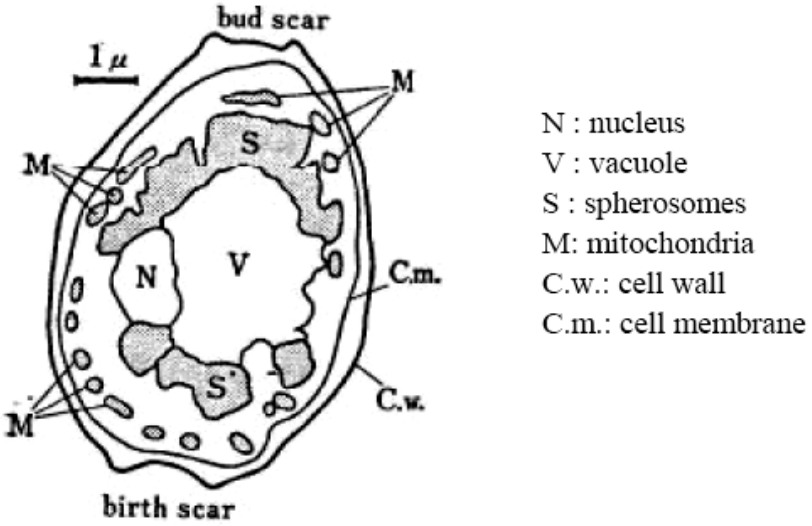


圖 2.6　酵母的細微構造[14]

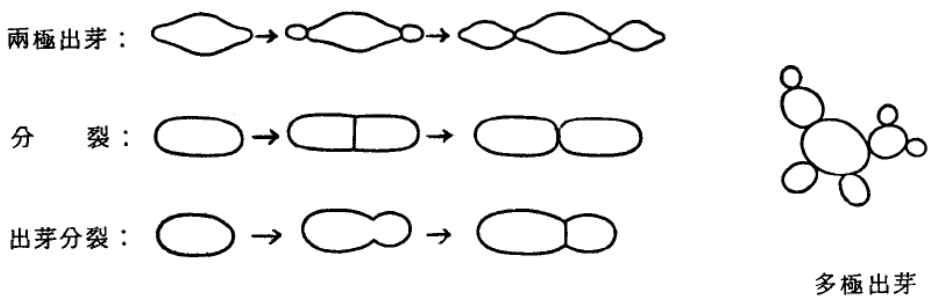
3. 增殖法：

酵母可以通過出芽進行無性生殖，也可以通過形成子囊孢子進行有性生殖。無性生殖即在環境條件適合時，從母細胞上長出一個芽，逐漸長到成熟大小後與母體分離。在營養狀況不好時，一些可進行有性生殖的酵母會形成孢子，在條件適合時再萌發。一些酵母，如假絲酵母（或稱唸珠菌，Candida）不能進行無性繁殖。

無性生殖包括出芽生殖與分裂生殖[12]：

(1) 多極出芽(multilateral budding)：同一個細胞上數個地方可以出芽者。

(2) 兩極出芽(bipolar budding)：只有細胞兩端才會出芽者(如Kloeckera spp.)。



(3) 分裂酵母(fission yeast)：非出芽，而是在細胞中央形成隔膜再分裂成兩個細胞者(如Schizosaccharomyces spp.)。

(4) 出芽分裂(bud fission)：出芽後基部不縮小，在子細胞與母細胞之間直接分裂的酵母謂之(如Saccharomycodes spp.)。

而有性生殖則有三種情形：一種是形成子囊孢子，這種酵母菌被歸為子囊菌。另一種是形成擔孢子，類似菇類的擔孢子，這類酵母菌被歸入擔子菌。而最後一種酵母菌，因為它們的有性生殖至今尚不了解，所以被歸入不完全菌。

4. 營養需求[15]：

酵母生長需有足夠碳源及氮源，此外也需一些金屬物質，如鎂、鈉、鈣、鐵、鋅、鈷、錳，及一些無機營養物質，如氯、硫、磷等。若原料中含有維生素如：生物素、泛酸、肌醇、維生素B_1、B_6及菸鹼酸等，可使酵母生長速率達到最高，因此目前市售營養劑除含氮之外，亦含其他多種營養物質。

5. 酵母的分類

酵母主要分為三類：Ascomycetaceous Yeasts (子囊菌酵母)、Basidiomycetaceous Yeasts (擔子菌酵母)與Fungi imperfecti yeast (不完全菌酵母)，如表2所示即為酵母的分類表[12]。

表2　酵母的分類

分類上的位置	(屬數)	屬　名	
Ascomycetes（子囊菌類）			
Endomycetales 目			
Saccharomycetaceae 科			
Schizosaccharomycoideae 亞科	(1)	*Schizosaccharomyces* *	有胞子酵母（子囊胞子酵母）
Nadsonioideae 亞科	(4)	*Nadsonia*、*Saccharomycodes* * *Hanseniaspora* *、*Wicherhamia*	有胞子酵母（子囊胞子酵母）
Saccharomycoideae 亞科	(13)	*Saccharomyces* *、*Kluyveromyces* * *Lodderomyces*、*Wingea*、 *Endomycopsis*、*Pichia* * *Hansenula* *、*Pachysolen*、 *Citeromyces*、*Debaryomces* * *Schwanniomyces*、*Dekkera* *Saccharomycopsis*	有胞子酵母（子囊胞子酵母）
Lipomycetoideae 亞科	(1)	*Lipomyces* *	有胞子酵母（子囊胞子酵母）
Spermophthoraceae 科	(3)	*Nematospora*、*Metschnikowa* *Coccoidiascus*	有胞子酵母（子囊胞子酵母）
Basidiomycetes（担子菌類）			
Ustilaginales 目	(2)	*Rhodosporidium* *Leucosporidium*	担子菌類酵母
Fungi Imperfecti（不完全菌類）			
Moniliales 目			
Sporobolomycetaceae 科	(3)	*Bullera* *Sporobolomyces* *Sporidiobolus*	射出胞子酵母
Cryptococcaceae 科	(12)	*Brettanomyces* *、*Candida*、 *Cryptococcus* *、*Kloeckera* * *Rhodotorula* *、*Schizoblastosporion* *Sterigmatomyces*、*Torulopsis* * *Oosporidium*、*Pityrosporum*、 *Trichosporon*、*Trigonopsis*	無胞子酵母

＊在次項「主要的酵母」中會出現的屬

6. 酵母屬（Saccharomyces）檢索表[12]

Ascomycetaceous Yeasts
(子囊菌酵母)
↓
Saccharomycetaceae：
子囊的形狀為球形或橢圓形
↓
Schizosaccharomyceoidea：
分裂生殖
→ Nadsonioideae：兩極出芽
→ Saccharomycoideae：多極出芽 → Saccharomycodes
→ Lipomycetoideae：
母細胞突出形成袋狀的子囊

Saccharomycodes屬的酒精發酵能力很強，為酵母中最重要的屬，是傳統以來各類酒、製造酒精、製造麵包等所使用的。細胞有球形、卵形或橢圓形。

2.7 厭氧發酵介紹[16]

1897年Buchner發現了酵素，提出了EMP途徑，才慢慢確立為生物生產酒精的代謝機構。本研究所使用的酵母菌的代謝路徑，主要是歸納至Galazzo和Bailey（1990）所提的研究結果，其代謝路徑可區分成八個反應步驟來進行探討，每一代謝反應步驟分別描述如下：

(1) 胞外葡萄糖經由Transportase催化反應將葡萄糖傳送到細胞內，稱為細胞內葡萄糖(Intracellular Glucose，Glc_{in})，此步驟的流通量(Flux)以$V_{Glc\ in}$表示。

(2) 細胞內葡萄糖經由Hexokinase催化反應形成葡萄糖-6-磷酸(Glucose 6-phosphate，G6P)，此步驟的流通量以V_{HK}表示。

(3) 葡萄糖-6-磷酸經由Phosphofructokinase催化反應形成果糖二磷酸(Fructose Diphosphate，FDP)，此步驟的流通量以V_{PFK}表示。

(4) 果糖二磷酸經由Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase催化反應形成磷酸烯醇丙酮酸(Phosphoenol Pyruvate，PEP)，此步驟的流通量以V_{GAPD}表示。

(5) 磷酸烯醇丙酮酸經由Pyruvate Kinase催化反應形成乙醇(Ethanol)，此步驟的流通量以V_{PK}表示。

(6) 葡萄糖-6-磷酸經由Glycogen Synthetase催化反應形成碳氫化合物(Carbohydrate)，此步驟的流通量以V_{Carb}表示。

(7) 果糖二磷酸經由Glycerol 3-phosphate Dehydrogenase催化反應形成甘油(Glycerol)，此步驟的流通量以V_{Gro}表示。

(8) ATP經由ATPase催化反應形成ADP，此步驟的流通量以V_{ATPase}表示。

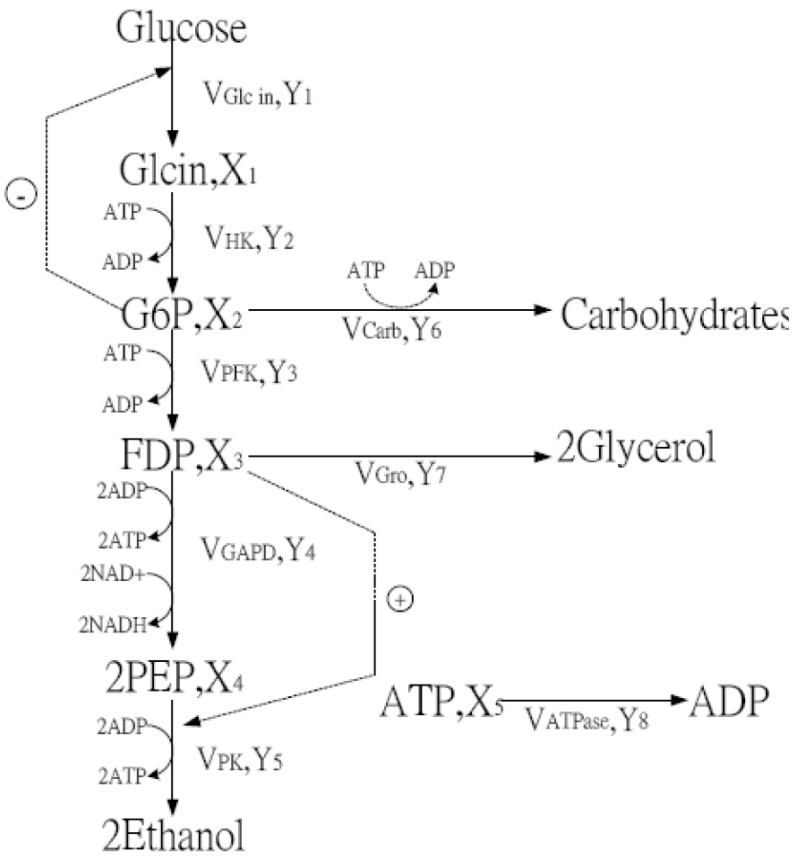


圖 2.7　酵母菌厭氧發酵代謝途徑[22]

2.8 酒精發酵[15]

酵母菌在無氧的狀態下會進行發酵，如圖2.8所示，葡萄糖在細胞內經糖解作用，將可發酵性的糖磷酸化後分解成磷酸三碳糖，再進一步分解成丙酮酸，丙酮酸經由去丙酮羧化酵素（pyruvate decarboxylase）作用生成乙醛，而後乙醛藉由乙醇去氫酵素（alcohol dehydrogenase）作用還原成酒精時，NADH被氧化成NAD^+，使得酒精的生成反應在無氧情況下得以不斷的進行。

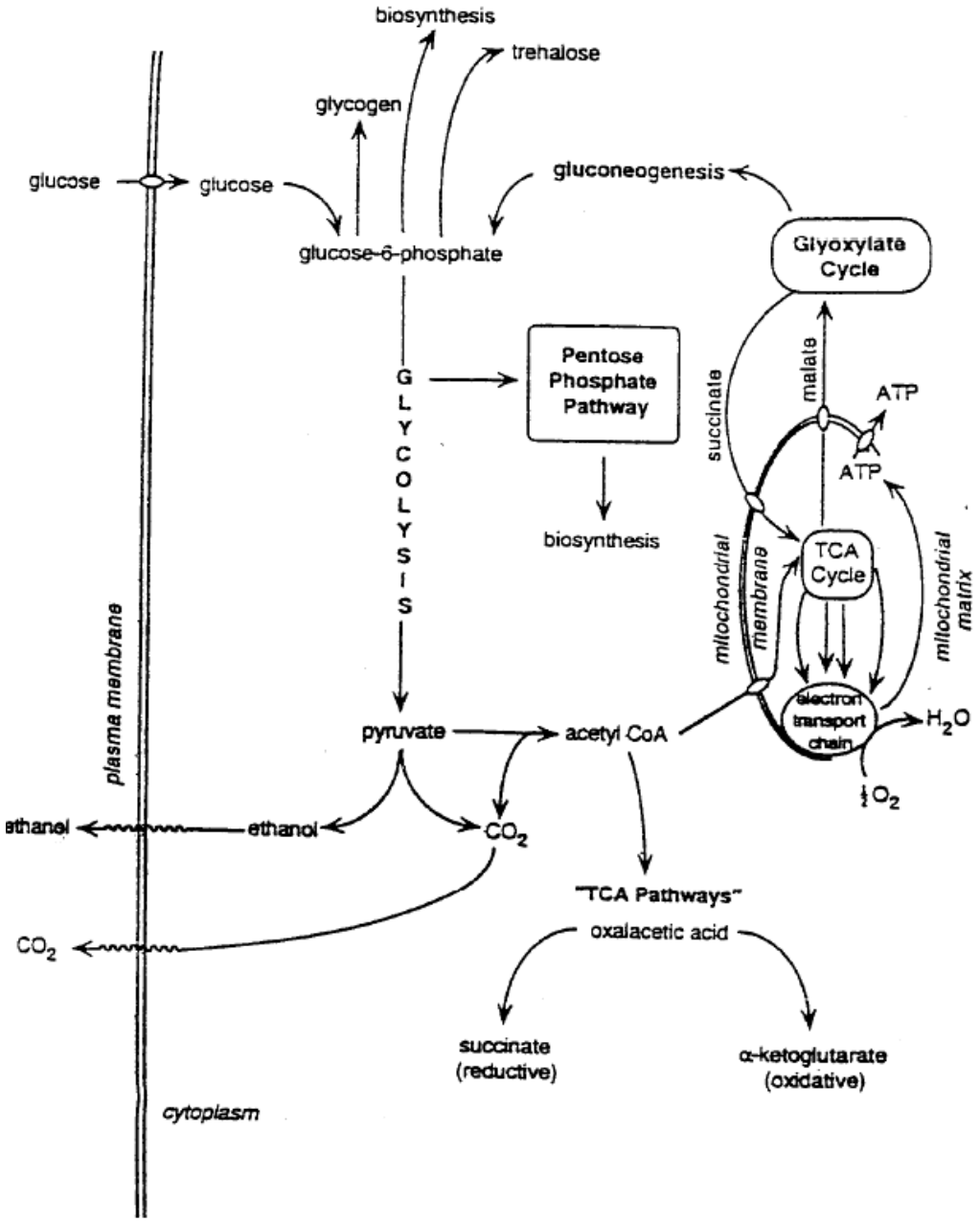


圖2.8　Saccharomyces 對碳源之主要代謝途徑[19]

在適當的溫度下（18~24℃），酵母菌才能表現出最佳的特性且完整的發酵。Amerine等人（1980）指出最適合大部份釀酒酵母的發酵溫度約為22~27℃，但此高溫會造成酒精的損失。溫度也影響酵母菌代謝所產生之二次代謝產物，例如：甘油、醋酸、琥珀酸等。

◎ 酒精產量計算方式[21]

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

$$\underset{(1g)}{C_6H_{12}O_6} \rightarrow \underset{(0.51g)}{2C_2H_5OH} + \underset{(0.49g)}{2CO_2}$$

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[13]：

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

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。

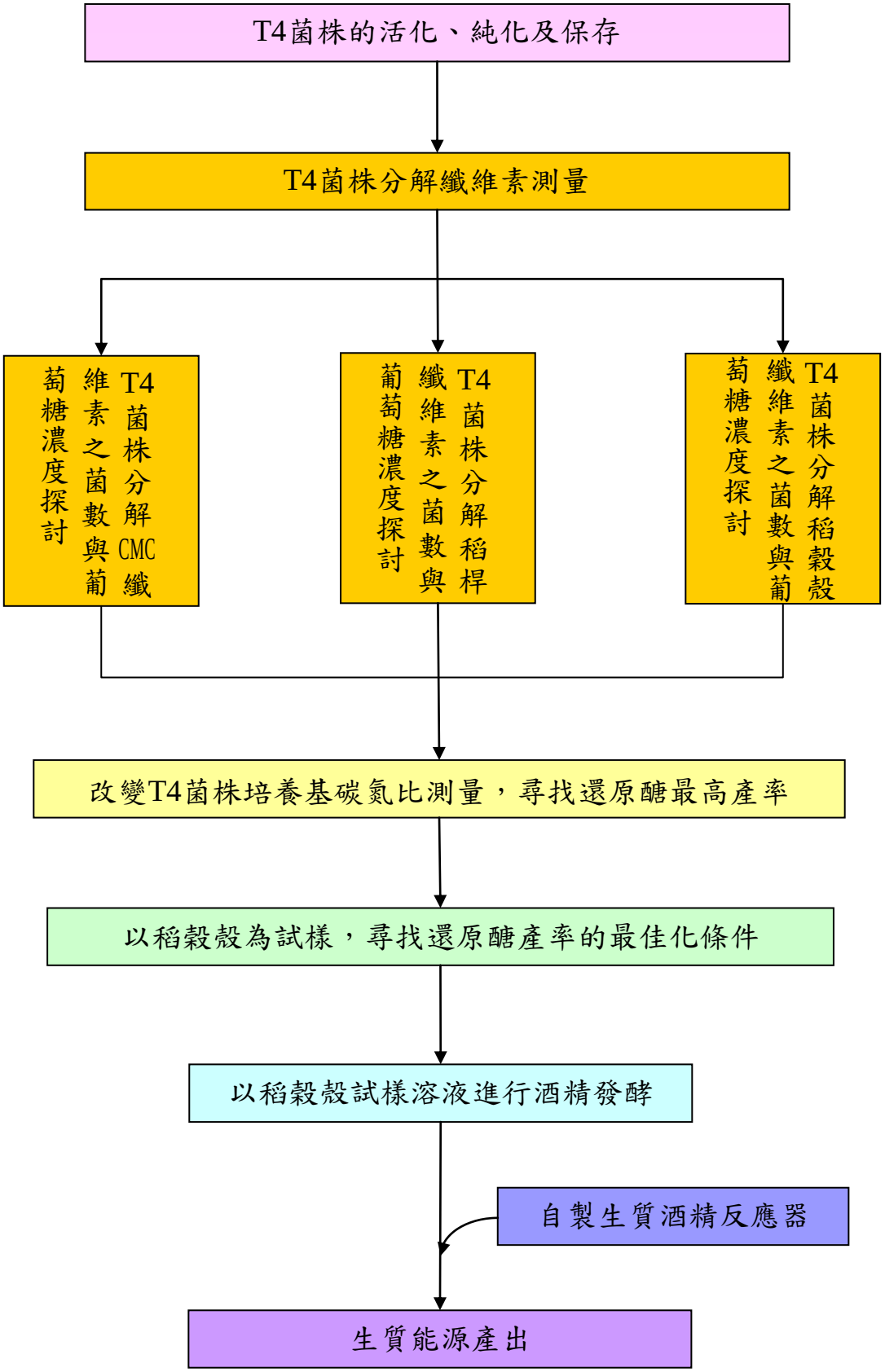
參、研究方向與架構

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(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。

根據上述目的，本研究分成六部分進行並探討下列問題：

1. 探討農業廢棄纖維素 (稻桿、稻穀殼) 與 T4 菌株作用時間與細菌濃度之關係。
2. 探討農業廢棄纖維素 (稻桿、稻穀殼) 與 T4 菌株作用時間與還原醣濃度之關係。
3. 比較於不同纖維素，細菌濃度與還原醣濃度隨時間變化之關係，
4. 比較培養基中不同氮碳比對同一種纖維素，細菌濃度與還原醣濃度變化關係找出纖維素分解為還原醣之最佳種類與最佳條件，作為下一階段：「轉換為生質能源」之準備。
5. 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。
6. 自製生質酒精反應器，將此生產技術更便利化與生活化。

肆、研究流程


T4菌株的活化、純化及保存
T4菌株分解纖維素測量
T4菌株分解CMC纖維素之菌數與葡萄糖濃度探討
T4菌株分解稻桿纖維素之菌數與葡萄糖濃度探討
T4菌株分解稻穀殼纖維素之菌數與葡萄糖濃度探討
改變T4菌株培養基碳氮比測量，尋找還原醣最高產率
以稻穀殼為試樣，尋找還原醣產率的最佳化條件
以稻穀殼試樣溶液進行酒精發酵
自製生質酒精反應器
生質能源產出

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）

其主要的配方如表3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3　Modified chemically defined CMC medium

Component	Content (per liter)
Peptone	1.0 g
CMC	10 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.4 g
Urea	0.3 g
KH_2PO_4	2.0 g
$CaCl_2$	0.34 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.3 g
$FeSO_4.7H_2O$	5.0 mg
$MnSO_4.H_2O$	1.6 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	1.4 mg
$CoCl_2.6H_2O$	2.0 mg
pH	7.0

（Mandels and Reese, 1957）

2. 稻稈、玉米秸、稻穀殼培養基

分別將取得的稻桿、玉米秸及稻穀殼，以80℃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，配製成稻桿、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。

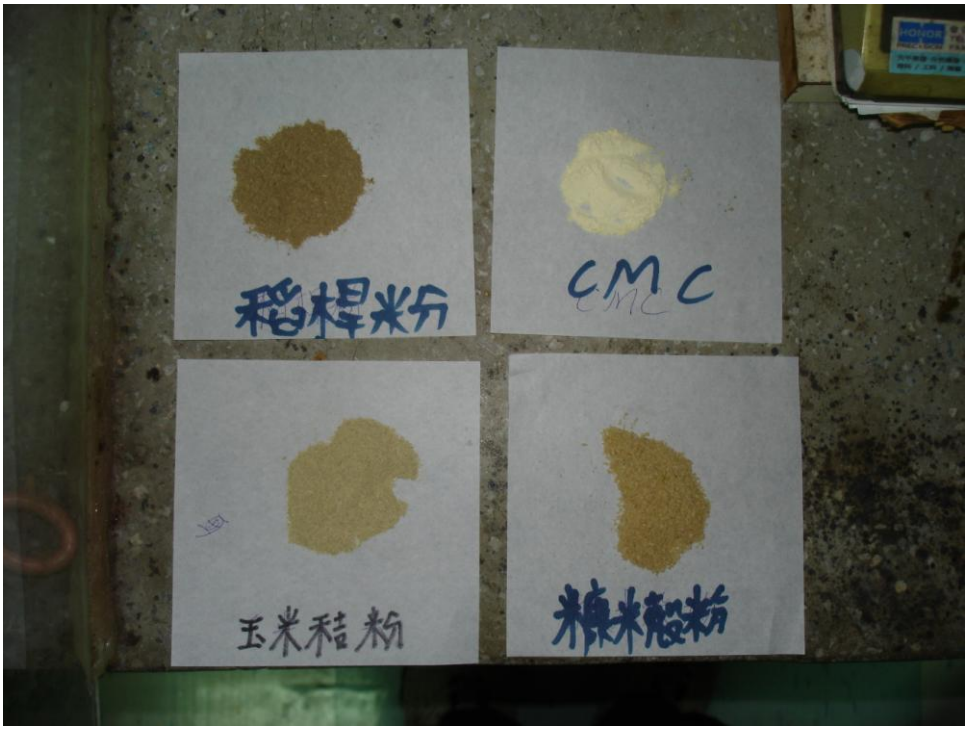


圖5.1 各種培養基之粉末

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4　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

如表5所示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℃的冷藏櫃保存。

表5　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

3,5-dinitrosalicylic acid → 3-amino-5-nitrosalicylic acid
（黃色）　　（橘紅色）

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_2O）至 100 mL。

四、T4 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℃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℃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℃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℃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, OD_{600}），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℃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，用滅菌過的水將菌液稀釋到適當的濃度，然後利用血球計數器放入光學顯微鏡中的方式來推算T4菌每2小時的總菌數目，連續測12小時。以及吸取1 mL 的菌液放入離心管中，靜置20分鐘後利用分光光度計測量其吸光值（OD_{600}），與血球計數器之結果做比較。

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NaH2PO4- Na2HPO4 磷酸鹽緩衝溶液）於100℃下水浴反應10分鐘後。以 DNS 法測定還原醣的含量。

3. DNS 還原醣的測定(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℃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。反應組測得之還原醣量減去對照組的還原醣量，所得的差值為酵素反應所釋放的還原醣量。

所得的吸光值利用葡萄糖標準曲線轉換成相當的還原醣量。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。

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

將 50 ml 的菌液分別置入 100 ml 60℃氮碳比 1:5~9 的纖維素培養基中，以 120 rpm 震盪培養，每兩小時取四管 1 ml 的菌液，測量其菌數吸光值(OD_{600})以及 DNS 吸光值(OD_{550})，以求出菌體濃度以及葡萄糖濃度。

2. 不同溫度環境分解效果測量

將 50 ml 的菌液分別置入 100 ml 的 55℃、60℃、65℃以及 70℃的纖維素培養基中，以 120 rpm 震盪培養，每兩小時取四管 1 ml 的菌液，測量其菌數吸光值(OD_{600})以及 DNS 吸光值(OD_{550})，以求出菌體濃度以及葡萄糖濃度。

3. 不同酸鹼值環境分解效果測量

將 50 ml 的菌液分別置於 100 ml pH 5~8 的纖維素培養基中，以 120 rpm 震盪培養，每兩小時取四管 1 ml 的菌液，測量其菌數吸光值(OD_{600})以及 DNS 吸光值(OD_{550})，以求出菌體濃度以及葡萄糖濃度。

七、酵母菌培養方式

1. 液態培養

取菌株 *Saccharomyces diastaticus* 種入其專用液態活化培養基100 mL 的錐形瓶中，培養 24 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 滴入另一瓶新的液態活化培養基100 mL 的錐形瓶中，在 24℃下，震盪 120 rpm ，培養 24 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 滴入另一瓶新的液態活化培養基100 mL的錐形瓶中，在24℃下，震盪 120 rpm，培養 24 小時，定時取樣。

2. 菌株的保存

將 *Saccharomyces diastaticus* 菌體種於表四之冷凍保存培養基培養，在24℃培養12 小時，在大量生長繁殖後，取2ml菌液，加入80 % 甘油2ml，混合均勻後置入-80℃的冷藏櫃保存。

3. 總生菌數的測定

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。

八、酵母菌厭氧培養環境條件測定

1. 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 震盪培養，每一小時將厭氧發酵培養基置入無菌操作做台內，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。

2. 酵母菌發酵率測量

將 100 ml 的酵母菌菌液置入 100 ml 發酵培養基，以 120 rpm 的震盪，進行酒精的發酵，每十二小時以電子天平測量其重量，並做不同時間重量變化的比較，進而推論出酒精產量。

將 100 ml 的酵母菌菌液置入 100 ml 發酵培養基，以 24℃ 120 rpm 的振盪，進行酒精的發酵，每 12 小時以電子天平測量其重量，並做不同時間重量變化的比較，進而推論出酒精產量。

結果發現加入酵母菌後的培養基重量下降速率會在前 12 小時之內最高，而在經過 12 小時之後則沒有太大變化，但是發酵反應還是持續的進行；經由微量天秤測量重量，再經由下列發酵率方程式的計算，便可以算出酒精的產量。

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

A：最初之總重量(g)，B：發酵終了之總重量(g)

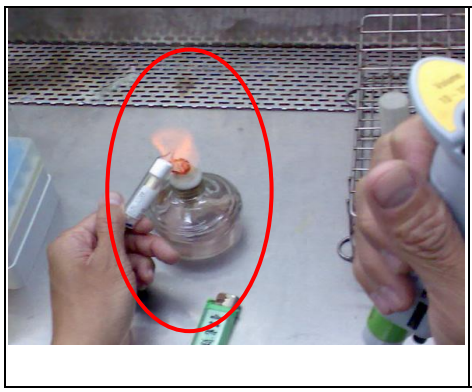
陸、結果與討論

第一部分 菌種活化、純化及保存

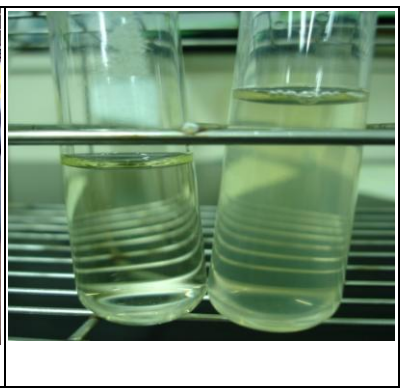
將自 BCRC 買來的 *G. thermoleovorans* T4 菌種放入 NB 培養液中進行活化，經過 16 小時，將菌液取出，重複上述動作三次後，即完成活化，開始進行純化。

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℃冰庫中保存即完成。



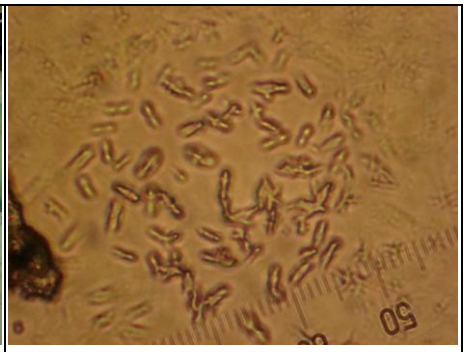
將購買 T4 菌種於無菌操作台上取出



活化後的 T4 菌
(右為一次活化，左為二次活化)

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)

第二部份 T4 菌於不同培養基之菌數生長與還原醣產量比較

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、稻桿以及稻穀殼培養基中細菌生長的狀況，結果發現（如圖 6.1 所示）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)，在稻穀殼培養基中生長的效果最好，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℃的培養下，T4 菌可在稻穀殼培養基中生長得最好，且數量在培養後 8 小時達到高峰。

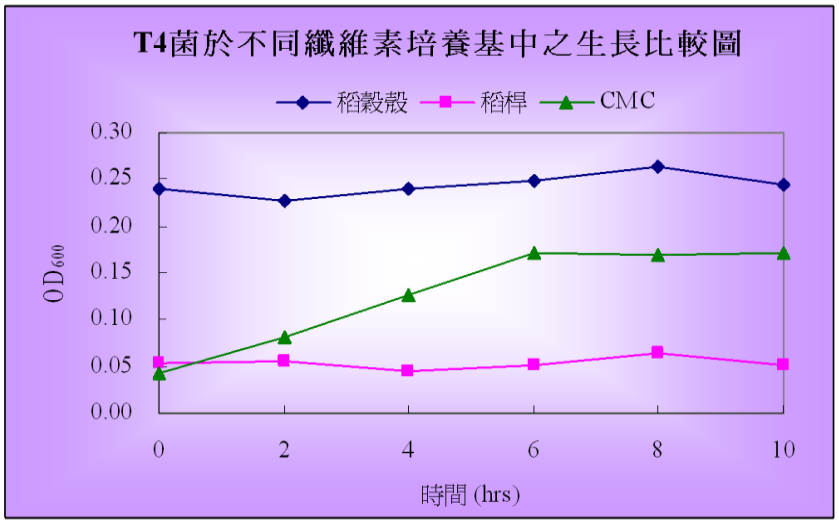


圖 6.1　T4 菌於不同培養基中之生長比較圖

由於 T4 菌具有纖維酵素活性，可分解 CMC 纖維素為還原糖，經由測量還原醣的結果，我們將有菌與無菌培養基的還原醣濃度相減以代表還原醣產量，結果發現(如圖 6.2 所示)T4 菌與 CMC 培養基作用約 4 個小時達到最大還原醣產量(平均還原醣產量 0.85 mM)；與稻桿培養基作用約 4 小時之後產生最多還原醣（平均還原醣產量 0.93 mM)，而稻穀殼培養基在作用約 2 小時即有最大還原醣產量（平均還原醣產量 2.15 mM)，**表示在 60℃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醣的能力，尤其在稻穀殼培養基中還原醣的產量最大也最快。**

將圖 6.2 所示的數值轉為還原醣的產率與產量，所得結果如表 6、表 7 所示，由圖 6.3 所示結果發現，由 T4 菌轉化廢棄纖維素為還原醣，稻穀殼的產率既高又快，在 2 小時後即有 21.50%的還原醣產率，但這樣的產率仍不是我們滿意的，因此**我們預計先調整稻穀殼的氮碳比值與反應溫度，尋找最佳產率的條件及反應器**，以期提高稻穀殼轉化為還原醣產率，降低轉化成本。

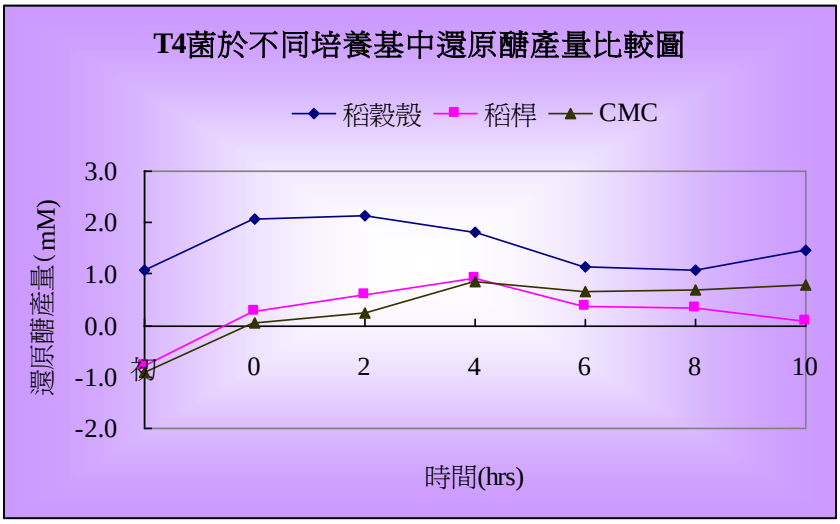


圖 6.3　T4 菌於不同培養基中還原醣產量比較圖

表 6　還原醣產量對照表

累積時數	CMC 產量(mM)	稻穀殼產量(mM)	稻桿產量(mM)
初	-0.91	1.07	-0.79
0	0.04	2.09	0.28
2	0.24	2.15	0.61
4	0.85	1.82	0.93
6	0.67	1.13	0.39
8	0.70	1.08	0.35
10	0.78	1.47	0.07

表 7　還原醣產率對照表

累積時數	CMC 產率	稻穀殼產率	稻桿產率
初	-9.13%	10.70%	-7.92%
0	0.45%	20.86%	2.84%
2	2.41%	21.50%	6.05%
4	8.49%	18.18%	9.31%
6	6.67%	11.34%	3.85%
8	7.01%	10.77%	3.47%
10	7.82%	14.73%	0.74%

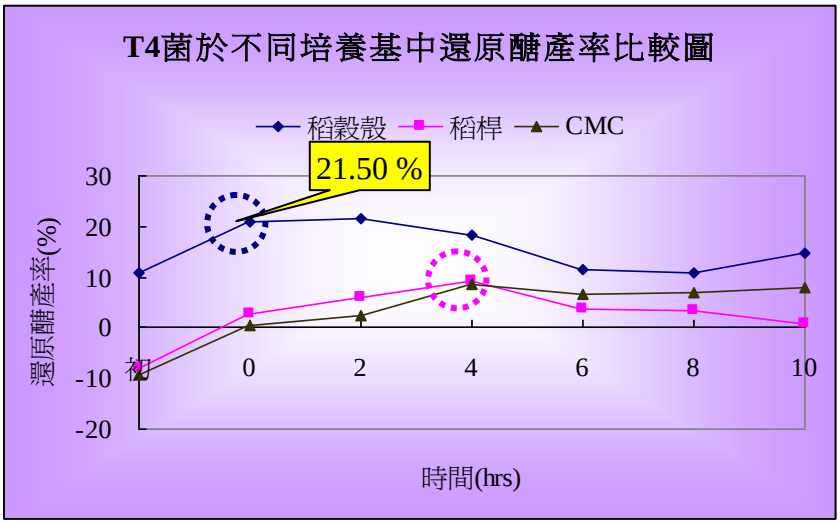


圖 6.3　各種培養基 1 克纖維素所產生的還原醣量產率比較圖

此外，比較圖 6.1 與圖 6.2 所示的結果，可發現當在不同培養基中，當細菌數量逐漸增加時，還原醣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還原醣作為養分的來源，導致還原醣濃度下降。

第三部份 調整培養基中氮碳比與反應條件對還原醣產率的影響

(一) T4 菌株分解不同氮碳比的 CMC(未蒸煮)培養基還原醣產率的比較

表 8 CMC 在不同氮碳比培養基中還原醣產率比較表

時間(hrs) / 培養基	0	2	4	6	8	10
CMC 未加菌	0.00%	-0.34%	-1.03%	1.03%	1.38%	-0.34%
CMC 加 T4 菌原 (N:C=1:6.3)	0.00%	12.07%	12.07%	0.00%	-0.34%	1.38%
CMC 加 T4 菌 (N:C=1:5)	0.00%	0.34%	1.72%	0.00%	2.76%	0.00%
CMC 加 T4 菌 (N:C=1:7)	0.00%	-2.41%	-1.03%	-2.07%	2.07%	8.96%
CMC 加 T4 菌 (N:C=1:9)	0.00%	20.69%	20.00%	26.89%	22.76%	-1.72%

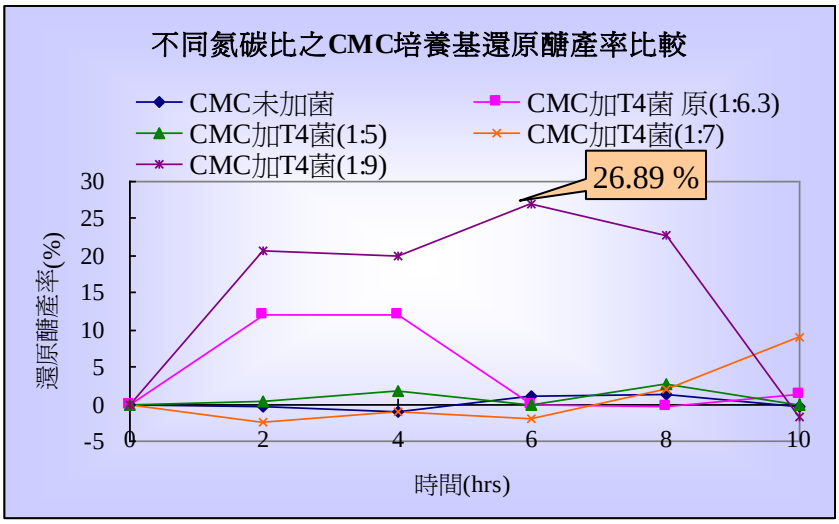


圖 6.4 CMC 在不同氮碳比培養基中還原醣產率比較圖

我們以 CMC 培養基做試驗，調整其中氮碳比，如圖 6.4 所示可知，N/C=1：9，反應時間為 6 小時，有最高還原醣產率 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醣的產率，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醣的產率。

(二) T4 菌株分解不同氮碳比的稻桿與稻穀殼纖維素還原醣產率的比較

1. 不同氮碳比的稻桿(未蒸煮)培養基還原醣產率的比較

表 9 稻桿(未蒸煮)在不同氮碳比培養基中還原醣產率比較表

時間(hrs) / 培養基	初	0	2	4	6	8	10
稻桿未加菌	2.86%	6.51%	6.20%	6.90%	5.90%	7.43%	4.92%
稻桿加 T4 菌 (N:C=1:3.4)	2.68%	6.89%	7.46%	8.90%	7.50%	9.29%	8.18%
稻桿加 T4 菌 (N:C=1:5)	2.26%	6.07%	6.70%	7.60%	7.20%	7.50%	7.63%
稻桿加 T4 菌 (N:C=1:7)	2.52%	6.98%	8.90%	8.10%	8.62%	10.78%	9.64%
稻桿加 T4 菌 (N:C=1:9)	2.21%	6.03%	11.60%	10.12%	12.91%	11.30%	7.19%

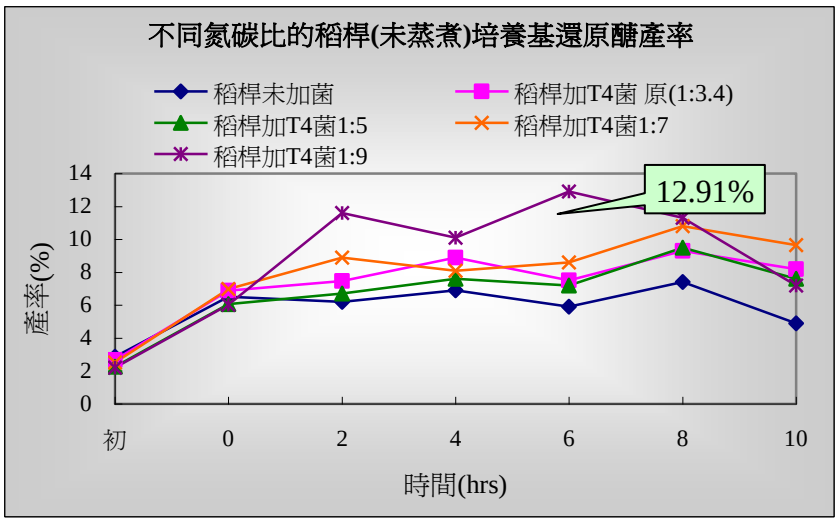


圖 6.5 未蒸煮稻桿在不同氮碳比培養基中還原醣產率比較圖

由圖 6.5 所示可知，稻桿在未預先蒸煮得情況下，於不同氮碳比培養基中還原醣產率一開始都有增加，N/C=1：9 的培養基明顯的有較高還原醣產率，在 6 小時有 12.91%的最高產率。

2. 不同氮碳比的纖維素稻桿(已蒸煮)培養基還原醣產率的比較

表 10　稻桿(已蒸煮)在不同氮碳比培養基中還原醣產率比較表

時間(hrs) / 培養基	初	0	2	4	6	8	10
稻桿未加菌	0.00%	22.17%	20.39%	20.58%	21.38%	20.19%	17.22%
稻桿加 T4 原 (N:C=1:3.4)	0.00%	21.77%	24.15%	25.73%	26.92%	24.54%	21.57%
稻桿加 T4 菌 (N:C=1:5)	0.00%	20.19%	22.17%	24.74%	27.31%	25.53%	24.34%
稻桿加 T4 菌 (N:C=1:7)	0.00%	21.18%	27.51%	29.69%	34.04%	22.56%	20.98%
稻桿加 T4 菌 (N:C=1:9)	0.00%	21.97%	27.11%	29.49%	37.41%	26.52%	21.97%

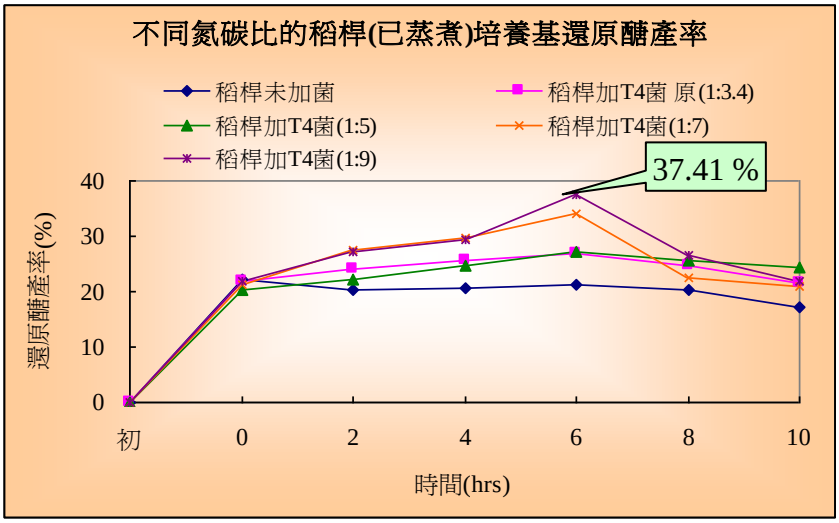


圖 6.6　已蒸煮稻桿在不同氮碳比培養基中還原醣產率比較圖

調整氮碳比之後，我們已經確定能將還原醣的產率有所提升，但我們仍舊不滿意，因此我們再嘗試將稻桿與稻穀殼在未加菌之前先以 6Kg/cm^2 的壓力、126℃的溫度加以蒸煮，利用瞬間減壓爆碎細胞壁，再加入 T4 菌株進行反應，由圖 6.5~圖 6.6 所示可知，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

已蒸煮的還原醣產率依次為 12.91%與 37.41%，可知將纖維素預先蒸煮是可以提升還原醣的產率，更何況因為學校設備的關係，我們並不能夠再增加溫度與壓力，否則應可預期有更高的還原醣產率才對。

表 11　稻穀殼(已蒸煮)在不同氮碳比培養基中還原醣產率比較表

時間(hrs) / 培養基	初	0	2	4	6	8	10
稻穀殼未加菌	0.00%	21.38%	22.17%	22.76%	28.90%	24.74%	23.95%
稻穀殼加 T4 菌原(N:C=1:6.3)	0.00%	19.79%	26.52%	28.90%	31.27%	31.67%	29.69%
稻穀殼加 T4 菌(N:C=1:5)	0.00%	21.97%	24.15%	28.50%	31.27%	32.46%	26.13%
稻穀殼加 T4 菌(N:C=1:7)	0.00%	23.16%	25.14%	42.95%	44.73%	51.66%	46.12%
稻穀殼加 T4 菌(N:C=1:9)	0.00%	20.98%	25.14%	35.82%	38.59%	43.34%	35.23%

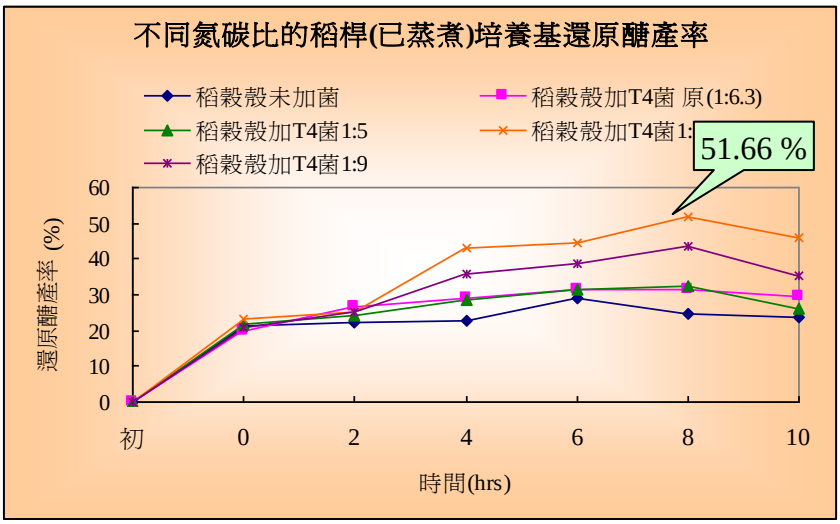


圖 6.7　稻穀殼在不同氮碳比培養基中還原醣產率比較圖

我們也嘗試將稻穀殼先蒸煮再加 T4 菌株進行反應，由圖 6.7 所示可知，在 N/C=1：7、反應時間同樣為 6 小時的條件下，還原醣的產率更高達 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反應的最佳 pH 值與溫度條件。

3. 針對稻穀殼進行反應條件最佳化探討

(1) 調整稻穀殼培養基氮碳比與纖維預先蒸煮對還原醣產率的影響

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，探討此菌在不同培養基的分解情況；由圖 6.8 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 8 小時之後各個培養基達到最高值並開始呈現下降的趨勢，其中以氮碳比 1：7 的培養基有最高值；此結果表示在稻穀殼培養基中，氮碳比 1：7 的培養基較適合於 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 還原醣測量法，測量其 DNS 吸光值以探討細菌是否能有效的將不同稻穀殼培養基分解為還原醣，由圖 6.9 所示中發現，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呈現平穩的狀態，加菌的培養基皆有上升的趨勢，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。此結果表示本研究所培養之 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，由圖 6.10 所示中得知，在氮碳比 1：7 時，其有最高產率 51.66%，相較於最原始產率 21.50%，明顯有大幅度的產率提升。

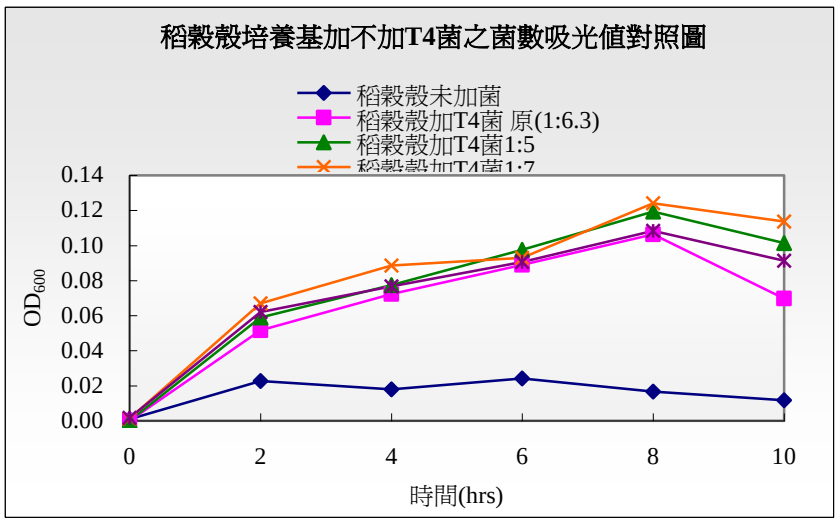


圖 6.8　T4 分解不同氮碳比稻穀殼培養基菌數吸光值對照圖

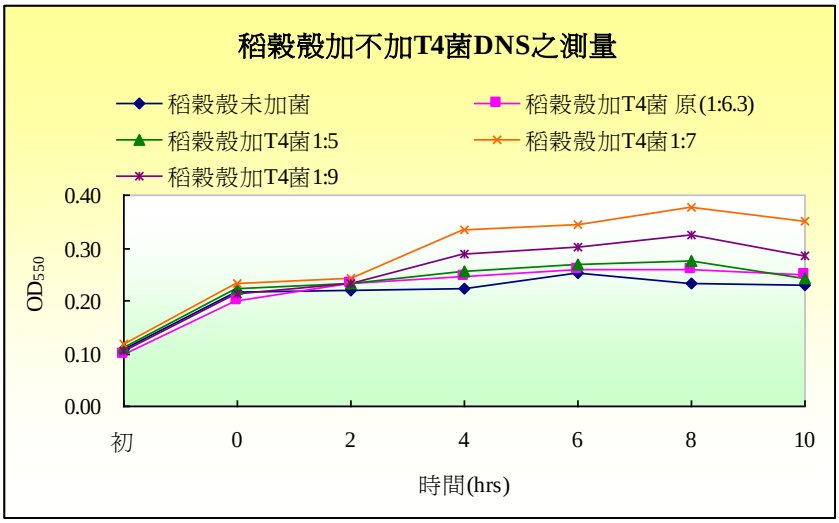


圖 6.9　T4 分解不同氮碳比稻穀殼培養基 DNS 吸光值對照圖

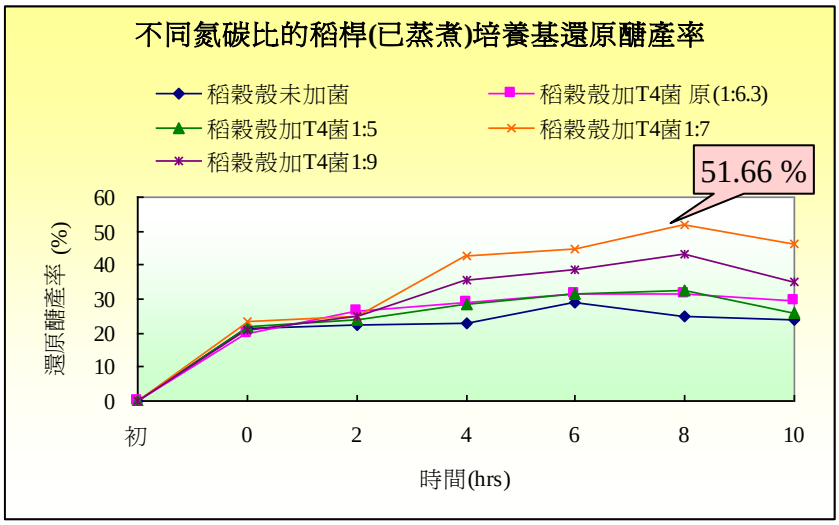


圖 6.10　T4 分解不同氮碳比稻穀殼培養基還原醣產率對照圖

(2) 定溫 60℃下培養基在不同酸鹼值中稻穀殼還原醣產率的比較

我們將溫度控制在 60℃，調整稻穀殼培養基在不同酸鹼度，加入 T4 菌之後，利用測量吸光值的方法，探討此菌在不同培養基的分解情況；由圖 6.11 所示中發現，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；此結果表示酸鹼度 pH =8 的稻穀殼培養基較適合於 T4 菌的生長，而 10 小時之後，T4 菌的菌數仍有繼續上升的趨勢。

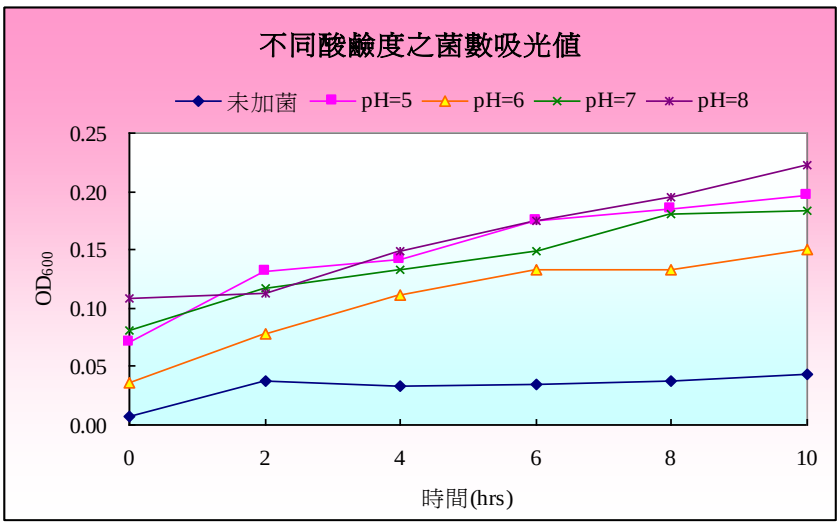


圖 6.11　T4 菌株在不同酸鹼度稻穀殼培養基中菌數吸光值對照圖

在不同稻穀殼培養基中加入 T4 菌之後，以 DNS 還原醣測量法，測量其 DNS 吸光值以探討細菌是否能有效的將不同稻穀殼培養基分解為還原醣，由圖 6.12 所示中發現，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 6.12 所示的還原醣產量換算為產率可得如圖 6.13 所示，由圖 6.13 中得知，在定 60℃下酸鹼度 pH =6 時，其有最高產率 51.34%，這個結果與圖 6-10 有極為近似的結果(51.66%)，而這二次實驗都是在 pH =6 及 60℃的環境下進行實驗的。

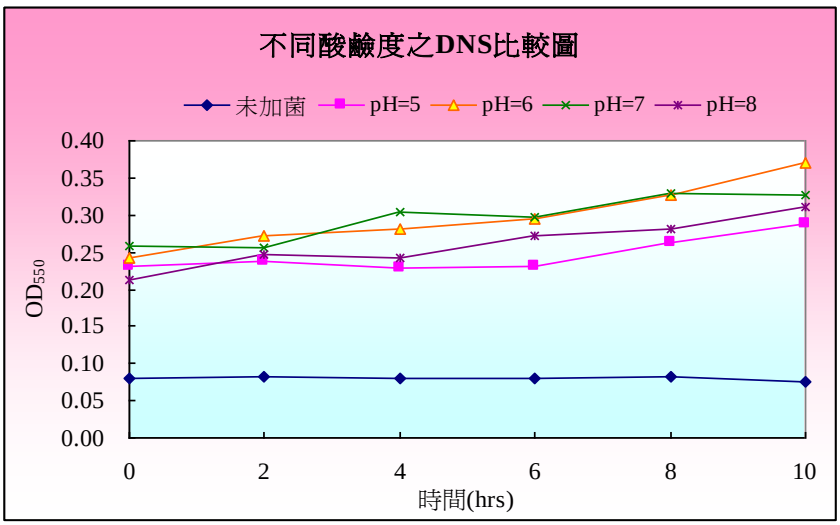


圖 6.12　T4 菌株在不同酸鹼度稻穀殼培養基中 DNS 吸光值對照圖

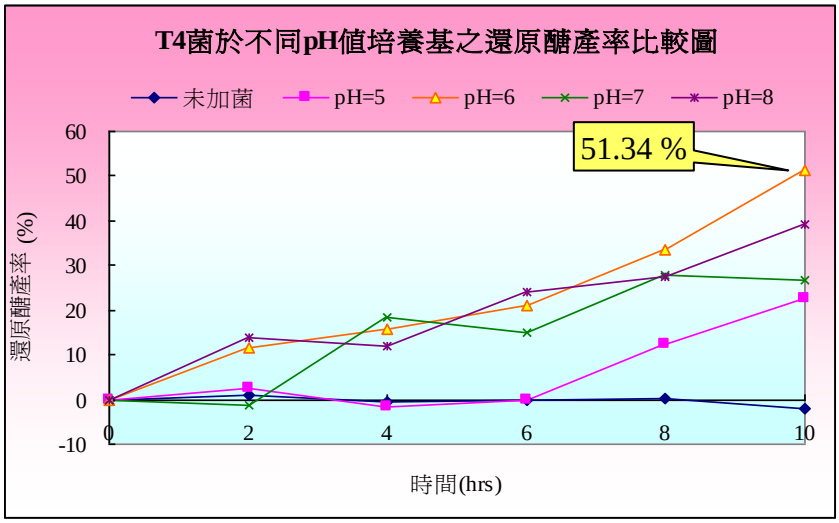


圖 6.13　T4 菌株在不同酸鹼度稻穀殼培養基中還原醣產率對照圖

(3) 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℃~70℃進行研究，由圖 6.14 所示可知，在 pH=6 的條件下 T4 菌株對稻穀殼的分解，在不同溫度下其還原醣的產率有極大差異，但以溫度 65℃、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℃時，反應 10 小時即有高達 69.81%的還原醣產率。**接下來，我們將生產生質酒精的工作，交予酵母菌來執行。

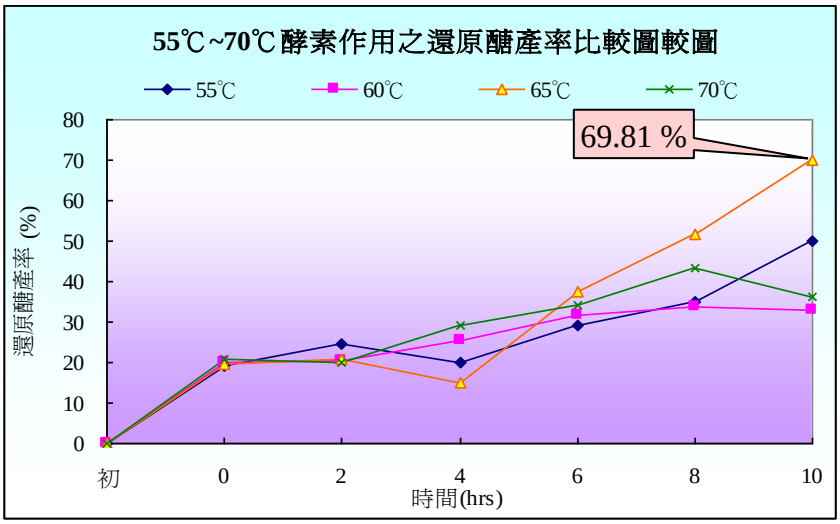


圖 6.14　T4 菌在 55℃~70℃溫度下分解稻穀殼其還原醣產率對照圖

第四部份 以酵母菌行酒精發酵製備生質酒精

(一) *Saccharomyces diastaticus* 菌種活化及保存

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，重複上述動作三次後，即完成活化。

並利用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℃的冷藏櫃保存。如圖 6.15 所示即為活化後之酵母菌行出芽生殖時放大 1000 倍之顯微照片。

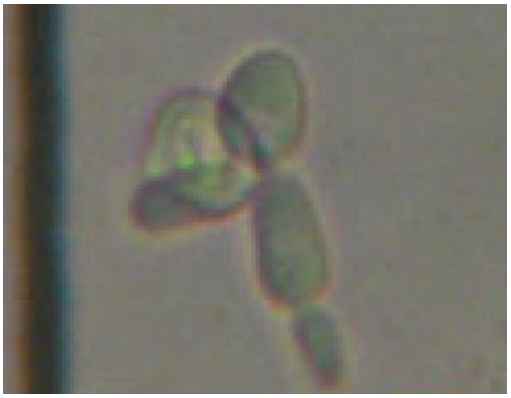


圖 6.15　多極出芽生殖的酵母菌(1000X)

(二) 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 6.16 所示結果發現，因 *Saccharomyces diastaticus* 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。此部分我們會再改良，希望能測量出酵母菌之生長曲線。

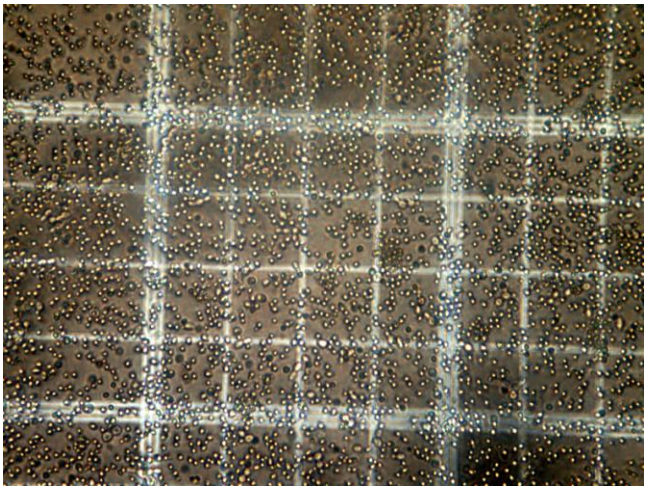


圖 6.16　血球計數器下的酵母菌(400X)

(三) 酵母菌發酵率測量

表 12　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
總醣可得酒精之理論值(g)	1.02*	0.899551※
發酵率 (%)	66.6%**	69.42%※※

* 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 0.15×16=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 值得其中含醣量，每 100mL 中有 1.763825g，故 1.763825×0.51=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-(0.15×6)= 0.6。

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

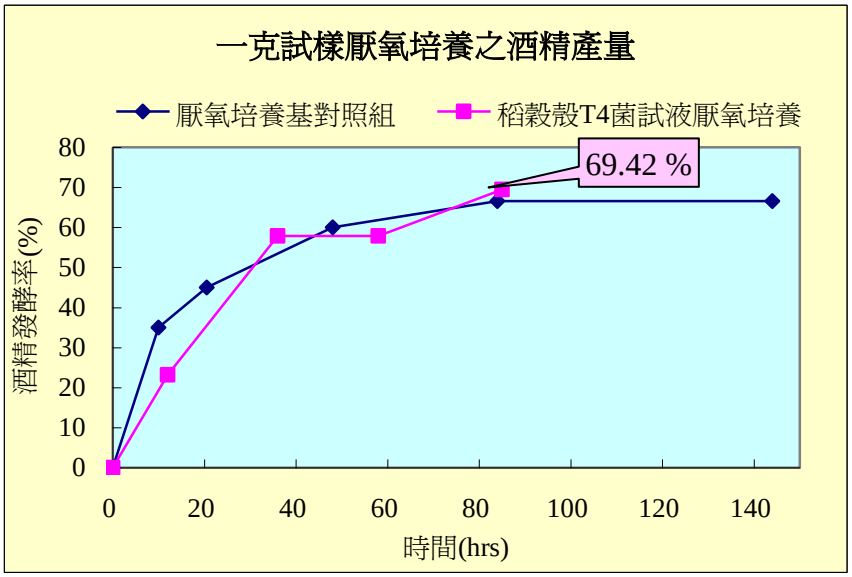


圖 6.17　*Saccharomyces diastaticus* 菌株之酒精發酵率

由以上結果可知，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醣為酒精的功能，因此在厭氧發酵培養基中，可測得重量有下降，而酒精有上升的趨勢，其結果可以證明，*Saccharomyces diastaticus* 有不錯的發酵能力。

同時，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，也有 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，以期能將生質酒精的產率再提升。

(四) 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 6.18 所示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。

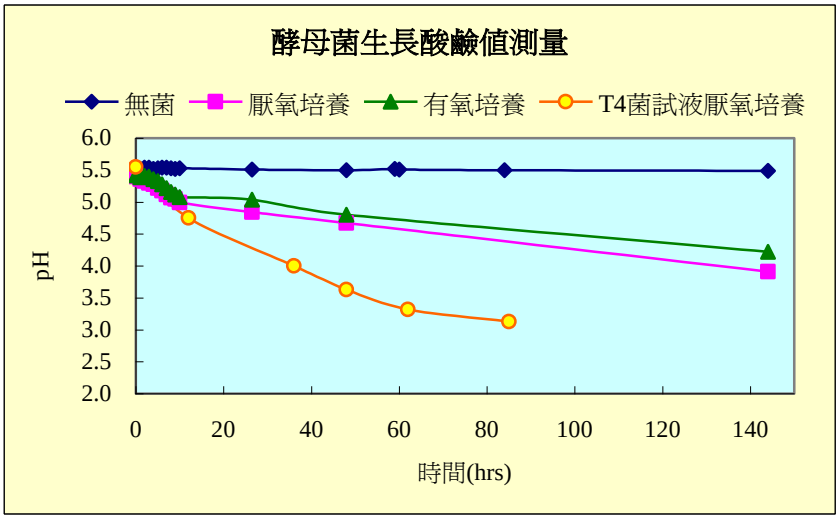


圖 6.18 *Saccharomyces diastaticus* 菌株之生長過程酸鹼值測量

(五) 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 6.19 所示可知，當酵母菌液體積為 30mL 時，在 72 小時候酒精發酵率達到 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，將纖維素轉換為生質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。

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，讓我們十分振奮！於是下一階段我們希望生產生質酒精的過程能更節能與方便化，因此展開微型生質酒精反應器的製作。

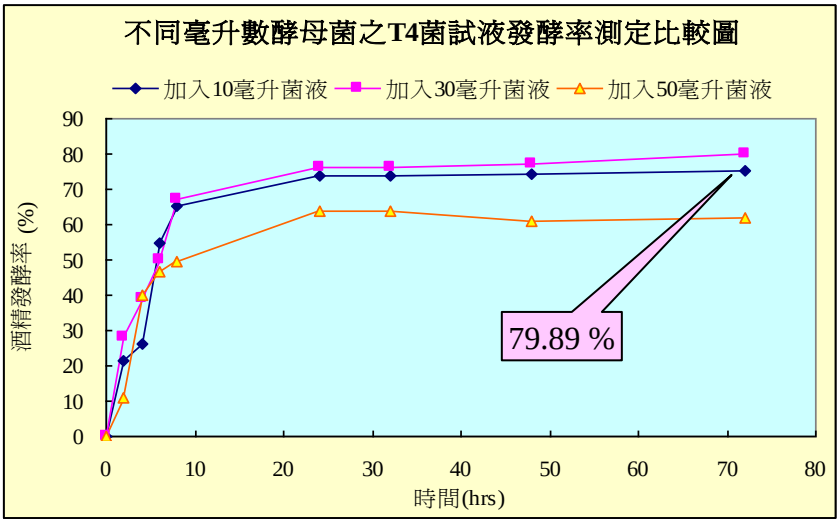
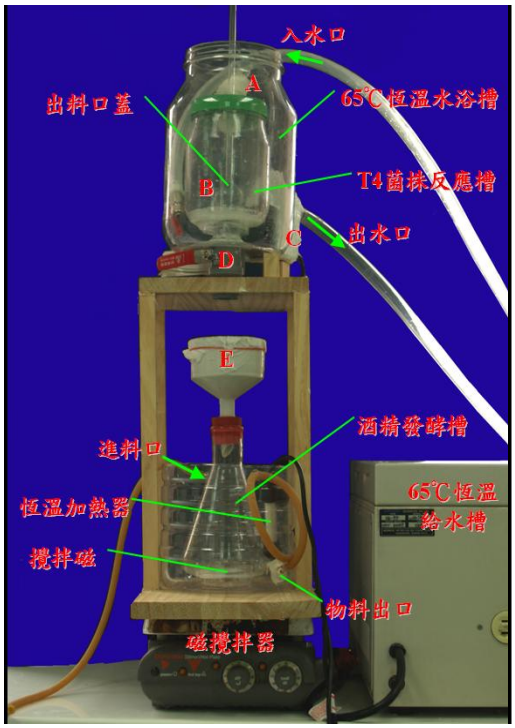


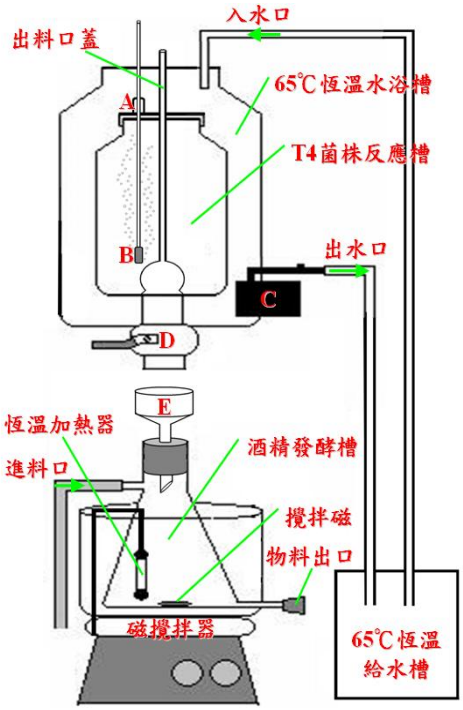
圖 6.19　不同毫升數酵母菌之 T4 菌試液發酵率測定比較圖

第五部份 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生質酒精的過程，不增加其他能源的耗損，所以我們構想自製一個微型化的生質酒精反應器，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：



(a)



(b)

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 1μm 孔徑的 P.P.棉，過濾 T4 菌株用(T4 菌體大小為長 1-5 μm，寬 0.7-1 μm)

柒、結論

本研究利用最先被報導具有纖維素分解能力的嗜高溫好氧菌*Geobacillus thermoleovorans* T4菌株，分解農業廢棄纖維素，成功地將稻桿與稻穀殼轉換為生質酒精，打破T4菌株僅止於學術研究的階段。目前獲得五個重要的結果：

1. T4菌株可以分解稻桿、稻穀殼為還原醣，初步醣產率稻桿在4 hrs有9.31%，稻穀殼在2 hrs有21.50%，但玉米秸的分解效果則不理想。
2. 調整培養基中氮碳比及將纖維素預先蒸煮都可以提升還原醣的產率，有最高還原醣產率的是稻穀殼的51.66%(N/C=1：7)。
3. T4菌株分解廢棄纖維素的最佳化條件為：**經過蒸煮的稻穀殼在培養基N/C=1：7、pH =6且溫度為65℃時，反應10小時即有高達69.81%的還原醣產率。**
4. 將稻穀殼在最佳化條件下將T4菌株反應後之溶液，植入*Saccharomyces diastaticus*酵母菌，初步的酒精發酵率為69.42%。
5. 在加入30mL的酵母菌進行反應72小時後，發現即有高達79.89%的酒精發酵率。
6. 本實驗在最佳化條件下，總計反應約34小時後，可將纖維素轉換為生質酒精的產率已達28%以上。
7. 自製生質酒精反應器，初步測試有不錯的轉化效果。

由數據顯示，本研究確能化腐朽為神奇，從稻穀殼的纖維素培養基中，製造出第一批的生質酒精，假以時日我們必能製得產率更大、純度更高的生質酒精，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。

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。

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木聚醣水解酵素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. Beguin, P., Aubert, J. P. 1993, The biological degradation of cellulose. FEMS. Microbiol. Rev. 13 : 25-58.

18. 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.

19. Boulton RB, Singletion VL, Bisson LF, Kundee RE. 1996. Principles and practices of winemaking. New York: Chapman & Hall.

20. Cecilia, L., and J. R. Mattoon. 1984, Development of Rapidly Fermenting Strains of Saccharomycesdiastaticus for Direct Conversion of Starch and Dextrins to Ethanol, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 48, No. 1, pp.17-25.

21. Dent DF. 1980. Mechanism of fermentation of brewing yeast in high salt concentration. Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society 14: 112-5.

22. 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.

23. 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.

24. 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.

25. Wood, T. M. 1985. Properties of cellulolytic enzyme systems. Biochem. Soc. Trans. 13 : 407-410.

評語

本作品以嗜高溫好氧菌 Geobacillus thermoleovorans T4 菌珠轉化農業廢棄纖維素為葡萄糖，以發展生質酒精，試驗結果確定以稻穀殼在 2 小時有 21.5%的還原醣產率，碳與氮之比例對還原醣產率之提昇有助益，蒸煮處理內附控制及 65 度 C 環境下，亦可再提高還原醣產率，而 Saccharomyces diastaticus 酵母菌在 72 小時候後，酒精發酵率可高達 79.89%，廢棄纖維素轉換為生質酒精的產率已達 28%以上。本作品雖創性不高，但實驗項目及過程完整，具實用之參考價值。