

嘉南藥理科技大學 97 年度教師專題研究計畫

重點研究總計畫名稱：生質酒精之連續式發酵及分離

子計畫名稱：纖維素糖化微生物與發酵菌之最佳培養條件探討

計畫編號：CN9709

執行期限：97 年 1 月 1 日至 97 年 12 月 31 日

子計畫主持人：張錦松

摘要

本研究擬由富含纖維素等葡萄糖聚合物的生質材料於好氣條件下進行纖維素糖化，進而由生物發酵而產製酒精，研究中將纖維素水解成木糖及葡萄糖，並探討纖維素水解菌之最佳生長條件，進而分離出糖醱酵所需之發酵菌種將糖轉化成酒精，利用 *Zymomonas mobilis* 菌種，探討最佳培養條件以提高生質酒精之生產效率。

研究動機與研究問題

生質酒精最經濟且實用的生產途徑之一即為利用廢棄的農作副產品為原料生產乙醇，例如：利用稻梗來生產生質酒精，以往農民會採用焚燒方式處理水稻殘體，此作法會造成空氣污染。相關經濟評估認為以稻梗為原料生產乙醇的成本將低於用糧食發酵生產乙醇的成本，而略高於煉油廠生產汽油的成本，但與汽油添加劑 MTBE（甲基第三丁基醚）的生產成本相比則低得多。儘管高纖維含量之農作物生產酒精有其優點，但對其生產技術和效率尚需作進一步探究。

目前纖維素轉換生質酒精的關鍵技術大致可以分為低廉能源作物的來源、生質的轉化技術、發酵菌種的篩選與改良、以及發酵製程的改良等四大類，發酵菌種的篩選與改

良目前主要之方向如下：

(1) 篩選能利用五碳糖之菌種

能利用五碳糖之菌種部多，研究目前發現有三種酵母菌 *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* 和 *Pachysolen tannophilus* 能利用五碳糖。

(2) 篩選高酒精耐性的菌種

由於高酒精濃度產物會抑制菌體的生長與酒精的繼續生成，因此篩選高酒精耐性（大於 40 g ethanol/L）的菌種也是不容忽視的。

(3) 篩選具抗細菌特性之酵母菌種

由於酒精發酵易受到乳酸菌的污染，因此若能篩選到能產生抗菌因子之酵母菌將能提高製程之穩定性，減少敗槽率。

研究方法與步驟

本研究向食品工業研究所的菌種保存及研究中心購買數種纖維素分解菌株，從中篩選出具有良好纖維素分解酵素活性之纖維素分解菌株，並分析其生理特性及酵素性質，期能使纖維素廢棄物能有效地再利用，以提高纖維素廢棄物的附加價值，達到資源化的目的。

纖維素分解菌篩選

1. 纖維素分解菌之分離

將購買的菌株取 1 g，置於內含 9 ml 的無

菌水且滅菌試管中，經振盪混合均勻後，取1 ml 的懸浮液作系列稀釋，以傾倒培養法 (pour culture)，倒入Mendels-Reese 培養基中進行平板培養，每天觀察並挑選菌落，挑選在此條件下可生長之單獨菌落 (single colony)，即具有生產纖維素分解酵素之菌株，作為本實驗的試驗菌株。

2. 纖維素分解菌的培養與保存

(1). 純化菌株

將所篩得之菌株接種於Mendels-Reese 培養基上畫線後，挑單一菌落保存備用。

(2). 菌株的保存

菌體培養於Mendels-Reese 之斜面培養基中，置於4 °C下保存，每一個月重新畫線培養一次。

*Zymomonas mobilis*是早期主要用於生產酒精飲料的細菌，它具有高的發酵選擇性和酒精產率，能耐高濃度的酒精和低的pH值，對水解糖液中的有害物有較強的耐受力。和一般酵母菌相比，它的酒精轉化率可提升5%~10%。在葡萄糖的發酵中，酒精的收率可達到97%，並能產生12%的酒精濃度(W/V)。轉殖基因的大腸桿菌(*Escherichia coli*)也常用於纖維素製酒精的流程中。如僅考慮葡萄糖的發酵，一般都用酵母菌，像是*Saccharomyces cerevisical* 便是相當好的菌種。

本研究由選擇性培養基篩選耐酒精的發酵菌，部分菌種(如：*Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21679, *Zymomonas mobilis* ATCC 29191)向食品工業研究所的菌種保存及研究中心購買並進行酒精生產率之測試。

結果與討論

在纖維素分解部分，研究探討酸解與生物分解菌的效果比較，首先在酸解部分，使用 1% H₂SO₄, 90 °C 酸解草類天然纖維素，如圖 1 所示，酸處理後可以得到還原糖以及葡萄糖，芒草研磨後酸解可以得到 3300 mg/L

還原糖，但是產生發酵需要的葡萄糖只有 310 mg/L。而圖 2 所示的芒草經過生物分解菌處理後，雖然還原糖較酸解少(131 mg/L)，但葡萄糖可以產出 950 mg/L，因此可見使用生物分解菌的效果較佳。

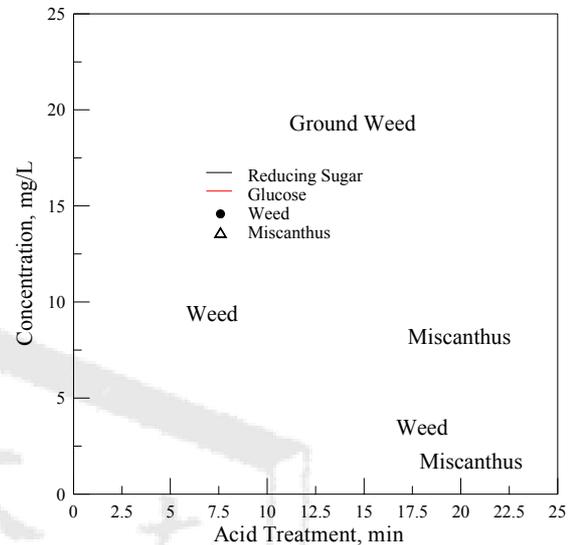


圖 1 各種草類酸處理後產糖量(30g biomass; 1% H₂SO₄, 90 °C)

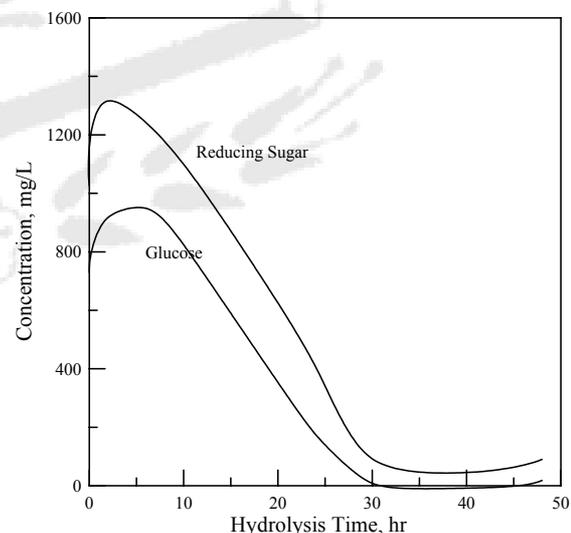


圖 2 芒草經生物處理後產糖量(Acid Pretreatment; 10g Weed+10ml *Trichoderma reesei*(enzyme+hypha); 100 ml medium; 30 °C)

第二階段為葡萄糖發酵酒精的部分，針對酸鹼度變化探討發酵環境對乙醇產率的影響如圖 3 所示，利用 *Zymomonas mobilis* 菌所發酵的結果顯示 pH 直在 3.35~4.22

間的產率變化不大但因為糖類分解成醇類後會產生酸，因次在酸性條件下系統較為穩定。

葡萄糖濃度分別為 10、20、30 及 35 wt%，

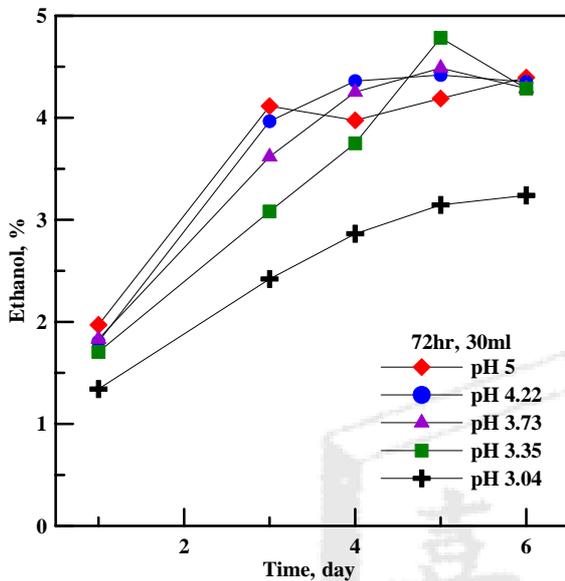
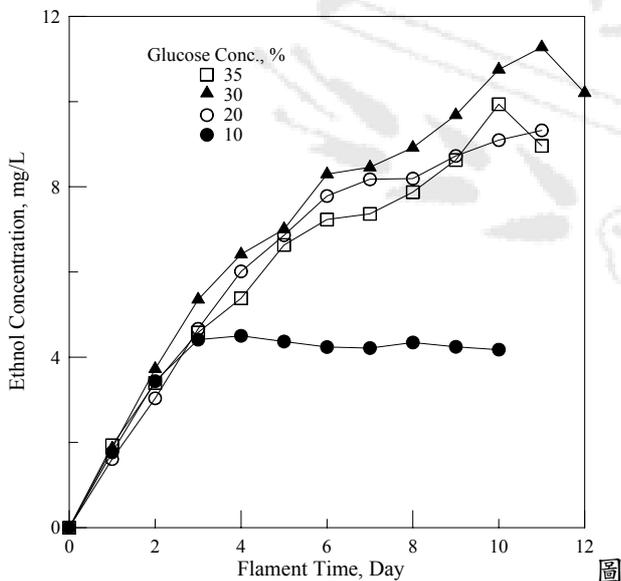


圖 3 酸鹼度對發酵乙醇濃度關係圖(glucose 10 wt%)



4 葡萄糖濃度與乙醇濃度關係圖

探討濃度對乙醇產率的影響結果如圖 4，實驗結果可以發現，批次反應中 10 wt% 在三天就會穩定，但 20 wt% 以上濃度需要穩定時間較長，產生乙醇濃度也較高，其中雖然 30 wt% 葡萄糖可以產出 11.6 wt% 乙

醇，但因為乙醇抑制作用，因此乙醇濃度劇降，因此建議使用 20 wt% 葡萄糖進行發酵反應較為穩定。

結論

1. 纖維素經過生物分解菌處理後，可有效產出 950 mg/L 葡萄糖，比酸解程序較佳(310 mg/L)。
2. *Zymomonas mobilis* 菌可有效將葡萄糖發酵為酒精，10 wt% 葡萄糖三天可發酵得到 4.8 wt% 乙醇。
3. 乙醇濃度隨發酵液中葡萄糖濃度提高而升高，30 wt% 葡萄糖可以產出 11.6 wt% 乙醇，但以單位產率來算，20 wt% 產率最高。
4. 未來研究方向為連續式進料發酵與分離系統的結合，並尋求最經濟且產率最高的纖維素生產生質酒精技術。

致謝

本研究承蒙嘉南藥理科技大學 97 年度教師專題研究計畫經費補助，特此致謝。

參考文獻

- Demain A. L., Newcomb M. and J. H. David Wu** 2005. Cellulase, Clostridia, and ethanol. *Microbiology and Molecular Biology Review* 69(1): 124-154.
- Gray K. A., Zhao L. and Emptage M.** 2006. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*. 10: 141-146.
- Hamelinck C. N., Hooijdonk G. V. and Faaij A. P.** 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*. 28: 384-410.
- Hu C., A. J. Englanda, Jr and Englanda J.** 2004. Bioremediation of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) by an innovation biofilter. *Water*

Science and Technology. 49(1): 87-94.

Murphy J. D. and McCarthy K. 2005. Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. *Applied Energy*. 82: 148-166.

Steven W. V. G. and Logan B. 2005. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research* 39:

3819-3826.

Waste Solutions Ltd, Estimate of the energy potential for fuel ethanol from putrescible waste in New Zealand, Prepared by Waste Solutions Ltd, June, 2005



嘉南藥理科技大學97年度教師專題研究計畫

重點研究總計畫

生質酒精之連續式發酵及分離

子計畫名稱

連續式薄膜生物反應槽系統製備生質酒精之研發

Study of a continuous plug-flow anaerobic membrane bioreactor process for bioethanol production

計畫編號：CN9710

執行期限：97年1月1日至97年12月31日

總計畫主持人：張錦松 嘉南藥理科技大學 環境工程與科學系

子計畫主持人：張家源 嘉南藥理科技大學 環境工程與科學系

一、摘要

本研究子題乃利用薄膜生物反應槽(membrane bioreactor, 簡稱 MBR)技術, 建構一連續式柱塞流式厭氧 MBR 酒精發酵系統, 轉換生質進料為乙醇溶液。研究以評估此新式反應系統產生乙醇之可行性為主要目的, 主要研究之參數為反應溶液 pH 值與系統溫度對乙醇產率之影響。研究結果顯示, 系統反應溶液 pH 值與系統溫度對乙醇之產率均有影響, 惟系統乙醇之產率仍有待提升。初步評估結果顯示, 此一連續式柱塞流式厭氧 MBR 系統可為製造生質酒精之替代方案。

關鍵詞：薄膜生物反應槽、生質酒精、厭氧發酵

Abstract

The purpose of this preliminary study was to assess the feasibility of a continuous plug-flow anaerobic membrane bioreactor process for bio-ethanol production. The results of this study indicated that the plug-flow anaerobic membrane bioreactor system has potential as a means of converting the sucrose solution into ethanol solution. The results also revealed that both pH and temperature were the significant factors for ethanol production. However, the further study to enhance the production rate of

ethanol is the most important topic in the future.

Keywords: Membrane bioreactor (MBR); bio-ethanol; anaerobic fermentation

二、緣由與目的

生質是指由光合作用衍生的生物物質, 例如玉米、高粱、小麥等穀類, 甘蔗、甜菜、糖漿、澱粉、糖等糖類, 以及纖維素等。生質酒精是指由生物物質所製成之酒精。生質酒精與汽油混合之燃料即為生質酒精汽油。在石油價格日益高漲及潛在的短缺問題, 傳統的微生物發酵再度引起人們的興趣。目前常見的酵素水解製程有兩種設計, 一種是水解和醱酵前後分開進行 SHF(Separate Hydrolysis and Fermentation), 另一種水解和醱酵同進行 SSF(Simultaneous Saccharification and Fermentation)。無論是 SHF 或 SSF, 纖維質經過水解程序之後, 纖維質已經被分解成六碳糖與五碳糖, 此時可分成個別醱酵與同時醱酵兩種方式進行。纖維素經水解後產生六碳糖, 半纖維素經水解產生之五碳糖, 也就是木糖(xyllose)為主要成份, 經微生物醱酵轉化為酒精。影響木糖轉化酒精製程的關鍵技術, 在於能否符合幾點重要需求, 如: 1.酒精容忍度 2.水解時對抑制物忍受度 3.醱酵條件 4.高產率 5.高產值。

本研究嘗試利用一連續式柱塞流式厭氧