

## 以微藻類水解液生產生質酒精

吳芳禎<sup>1</sup> 廖易濬<sup>2</sup> 王曼瑩<sup>2</sup> 施英隆<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>大葉大學生物產業科技學系

<sup>2</sup>大葉大學環境工程學系

51591 彰化縣大村鄉學府路 168 號

\*ils@mail.dyu.edu.tw

### 摘要

由於近幾年來全球暖化、化石燃料之即將用罄與原油價格日漸提升，迫使人類不得不尋找可再生、經濟、有效、能永續且同時能降低溫室氣體排放之替代能源，而以可再生生質來生產生質酒精是關鍵選擇方案之一。由於微藻易於培植、生長迅速、為非食用作物、不佔地且有能能力快速累積碳水化合物等優點，使其具有相當大潛力作為發酵生產生質酒精之生質原料。本研究探討微藻 *Chlorella* sp. Y8-1 之最適水解條件及利用水解液於生質酒精的發酵。結果發現微藻水解糖化之最適條件為將 20 g/L 藻粉加入 0.1 N 硫酸溶液，再於高壓滅菌釜（121℃）進行酸水解 60 min，之後調整至 pH 5，加入纖維酶（1%，w/w）於 50℃、100 rpm 反應 12 小時。微藻水解可得葡萄糖產率為 25.9%（產量 5.19 g/L），半乳糖產率為 8.3%（1.65 g/L），纖維雙糖產率為 10.4%（2.08 g/L）。將微藻類水解液作為碳源，並添加 2 g/L Yeast extract，以固定化菌培養方式在 30℃ 靜置培養 48 小時以生產酒精，發現發酵微藻水解液消耗單醣量總和為 7.35 g/L 並產生 3.50 g/L 酒精，轉化率為 93%。本研究證實利用連續稀酸/酵素之水解方式與使用 *Saccharomyces cerevisiae* Wu-Y2 發酵微藻水解液可有效以微藻 *Chlorella* sp. Y8-1 為生質原料來生產生質酒精，在生質能源之發展具有相當大的潛力。

**關鍵詞：**生質酒精，微藻，酵素水解，酵母菌，發酵

## Fermentation of Microalgae Hydrolysate for Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*

FANG-CHEN WU<sup>1</sup>, YI-JYUN LIAO<sup>2</sup>, MAN-YING WANG<sup>2</sup> and ING-LUNG SHIH<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioindustry Technology, Da-Yeh University

<sup>2</sup>Department of Environmental Engineering, Da-Yeh University

No. 168 University Rd., Dacun, Changhua 51591, Taiwan, R.O.C.

\*ils@mail.dyu.edu.tw

### ABSTRACT

Increasing global energy demands alongside concerns over the depletion of fossil energy resources and significant climate change have compelled people to actively seek alternative fuels that

are sustainable, environmentally friendly, and cost efficient. Bioethanol produced from various renewable feedstocks is considered a clean and renewable energy source that ranks among the best options for renewable energy sources. The utilization of microalgal biomass as feedstock for bioethanol production is promising, owing to its numerous advantages such as fast growth rate, low land usage, high carbon uptake rate, nonfood usage, and the ability to accumulate substantial amounts of carbohydrates. The aim of the present study was to investigate the sequential acid/enzymatic hydrolysis of microalgae *Chlorella* sp. Y8-1 and the fermentation of the hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* Wu-Y2, a newly isolated yeast strain, for bioethanol production. The results revealed that the optimal saccharification process was derived when 20 g/L of *Chlorella* sp. powder was hydrolyzed by 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and autoclaved (131 °C) for 60 min, followed by adjustment to pH 5, with an addition of 1% cellulase and incubation at 50 °C for 12 h. The main sugars in the hydrolysate for *Chlorella* sp. were glucose (5.19 g/L; 25.9%, w/w, dry base), galactose (1.65 g/L; 8.3%, w/w, dry base), and cellobiose (2.08 g/L; 10.4%, w/w). The strain of *S. cerevisiae* Wu-Y2 was observed to effectively utilize the glucose and galactose in the hydrolysate. When the obtained hydrolysates were supplemented with 2 g/L yeast extract, inoculated with 10% of immobilized *S. cerevisiae* Wu-Y2, and then incubated at 30 °C for 48 h, 7.35 g/L of mono sugars was consumed and 3.50 g/L (93%) of bioethanol was produced from the *Chlorella* sp. hydrolysate.

**Key Words:** Bioethanol, *Chlorella* sp. Y8-1, enzymatic hydrolysis, algal hydrolysate, fermentation

## 一、前言

近幾年來全球暖化、化石燃料之即將用罄與原油價格日漸提升已引起人類之極端重視，由於情況之嚴重已迫使人類不得不尋找可再生、經濟、有效、能永續之替代能源且同時能降低溫室氣體之排放 [17]。生質柴油與生質酒精是兩種最普遍與成功之生質能源，生質酒精可由豐富之澱粉/纖維素之生質原料所生產，而生質柴油則由生質能源作物，例如油菜籽 (rapeseed)、菜籽油 (canola)、花生 (peanut)、油棕 (oil palm)、麻瘋樹 (jatropha) 所生產。然而第一代生質能源主要以食物原料作物作為生產生質柴油與生質酒精之主要原料，因此引起能源開發衝擊食物供給與安全之疑慮。使用非食物原料作物來開發生質能源已刻不容緩 [16]，因此最近各國的研究集中在以木質纖維素為原料。木質纖維素是地球上最豐富的可再生資源，大量存在於地球上的草本與木本植物間，以及各式農業、木材與其他廢棄物之中，據估計木質纖維素原料占世界生物質 (100 億~500 億噸) 的 50%。雖然目前以木質纖維素生產生質酒精之成本較第一代生質燃料高，不過由於其量多、原料價格較低且作物纖維素含量高，因此以其為原料生產生質酒精可使糧食不足、土地過度開墾等問題得以減緩，彌補第一代生質燃料之缺陷，具有發展潛力 [3]。

除木質纖維素為原料開發之第二代生質酒精之生產外，海藻 (巨藻) 近幾年已成為生產生質酒精之重要生質原料，深獲重視 [14, 20, 22-23]。作為生產生質酒精之重要生質原料，海藻比木質纖維素具有更多優勢，因為海藻生長快速，光合作用效率約 6~8%，高於陸生植物的 1.8~2.2%，是非常有效率的 CO<sub>2</sub> 固定者 (CO<sub>2</sub> fixers) [10]。藻類能夠固定 CO<sub>2</sub> 之能力已經被提議用來做為去除發電廠所排放廢氣中 CO<sub>2</sub> 的方法，進而減少溫室氣體 (green house gas, GHG) 的排放量以達減碳的目的 [13]。因為藻類容易適應生長環境，可生長於淡水或海水中的，可在海中立體生長，不會與糧食作物競爭陸地資源 [4]，而且地球表面有三分之二是被水覆蓋的，因此在全球能源需求方面，藻類被認為是最具有發展潛力的生質能源原料之一。除了高產量、不佔用陸地面積之外，海藻纖維素分子 (大約以 160 個葡萄糖鏈結) 小於陸生植物的纖維素分子 (約 360 至 1,000 個葡萄糖鏈結)，且經常缺乏半纖維素及木質素等結構分子，使得海藻結構較陸生植物鬆散，因此醱解步驟較易進行、成本較低。大型藻類 (巨藻類) 含有高量的多醣體 (50~90% 以上)，將這些多醣體降解成簡單的單醣後可進而發酵產生酒精 [11]。

微藻的數量繁多，已知的種類超過 3,000 種，分布在全球各地，顯見其對於環境的適應力。微藻易於培植，同時生長又相當迅速，只要 2~6 天即可採收。如以其產製燃料，生

產週期是陸生植物無法達到的水準，相對產量也就更高。微藻最為人注意的是其超高的油脂含量，是大豆的25~200倍，因此利用微藻開發生質柴油已受到相當重視 [5, 12]。除高含油外，已知有多種微藻或藍藻（或藍綠藻）可累積大量之儲存多醣，且微藻細胞壁也蘊含纖維多醣，這些多醣可以化學或酵素方法水解成可轉化為酒精之單醣，因此以微藻為生質原料以生產生質酒精已漸受重視。況且微藻之組成成分易受培養條件調控，例如高密度培養或營養缺乏培養可導致一些微藻累積大量之醣類，甚至高達65% [8, 11]，因此已有研究探討以微藻為生質原料以生產生質酒精 [15, 18-19]。本研究主要探討微藻之水解及利用於酒精發酵的結果。

## 二、材料與方法

### (一) 材料

本實驗所使用之微藻 (*Chlorella* sp. Y8-1) 為自篩之微藻 [2]，經培養及離心後將藻體以 60°C 烘乾，並磨成粉末置於室溫下保存備用。纖維分解酵素 (Cellulase) 購自嘉年生化產品有限公司 (臺灣斗六)。酒精生產菌株 *Saccharomyces cerevisiae* Wu-Y2，篩自於水果酒工廠的淤泥 [21]。菌株培養基成分之酵母萃取物、牛肉萃取物等購自 DIFCO (Michigan, USA.)，其他藥品購自日本片山藥品公司。

### (二) 微藻成分分析

微藻 (*Chlorella* sp. Y8-1) 之水份、粗蛋白、粗脂肪、粗灰份、碳水化合物及海藻多醣含量之分析係根據 Fan 等人 [6] 使用 AOAC 標準檢驗方法之修正版方法。簡述之，微藻 (*Chlorella* sp. Y8-1) 樣品 (2 g) 在 105 °C 烘箱乾燥至恆重以測水份，粗灰份係將樣品在 550 °C 爐中鍛燒過夜，粗蛋白係以凱氏法 (micro-Kjeldahl) 分析並以轉換率 6.25 換算，粗脂肪係以乙醚索氏 (Soxhlet) 萃取，各成分以重量百分比計。粗纖維成分係連續以 1.25 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 及 1.25 % NaOH 萃取微藻樣品後之殘渣在 105 °C 烘箱乾燥 5 小時，再於 550 °C 爐中鍛燒過夜，乾燥及鍛燒後兩者之重量差為粗纖維成分。碳水化合物之計算公式為：碳水化合物 (%) = [100 % - (粗蛋白、粗脂肪、粗灰份之百分比加總)]。

### (三) 以連續酸/酵素水解糖化微藻 (*Chlorella* sp. Y8-1)

在本試驗中首先探討酸水解糖化微藻之最佳條件，把 2 克的微藻 (*Chlorella* sp. Y8-1) 粉末加入 100mL 硫酸溶液中並於滅菌釜 121°C 中進行酸水解，變化不同硫酸濃度 (0.05N、0.1N、0.3N、0.5N) 及不同酸水解時間 (10min、20min、30min、

40min、50min、60min)，水解期間取樣並離心 (10,000 x g, 10 min)，取上清液並以下述 HPLC 進行醣類濃度之分析。酵素水解係將酸水解液以 NaOH 溶液與 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液調整至不同 pH 至 (pH 2-8)，之後加入不同量的纖維水解酵素 (w/v; 1 %、2 %、4 %、6 % 及 8 %) 後放入培養箱，在溫度 50°C 轉速 100 rpm 反應 6-12 小時，並定時取點，將取出之樣品以 100°C 沸水煮 10 min 將酵素失活後，以離心機 10000 rpm, 10 min 離心取上清液，再經由 0.47 μm 過濾膜過濾後，經由 HPLC 分析其水解的醣類種類與濃度。水解糖化後，水解液過濾 (300 mesh) 後煮沸讓酵素失活後離心取上清液，將上清液加入 2 g/L 酵母萃取物 (yeast extract, YE) 放入滅菌滅菌 (121°C、20 min) 以利後續之酒精發酵。

### (四) 以懸浮菌發酵微藻水解液以生產生質酒精

配取 100 mL 固態培養基 (Glucose 10 g/L, Yeast extract 10 g/L, Agar 15 g/L) 於 250 mL 的三角錐形瓶中，滅菌後置入數個培養皿中使其凝固後待用。利用白金鉗鉤接種環在保存培養基中刮取適量的菌體，將菌體接種於固態培養皿上，在 30°C 下靜置培養 48 小時。在已培養 48 小時後的固態培養基上，以白金鉗鉤接種環刮取適量的菌體置入含有 100 mL 活化培養基 (Glucose 10 g/L, Yeast extract 10 g/L) 於 250 mL 的三角錐形瓶中，在 30°C 下靜置培養 24 小時。將 10 % (w/v) 活化菌置入含 300 mL 上述藻類水解液之 500 mL 三角錐形瓶中，於 30°C 靜置培養 48 小時。酒精、單糖之變化情形以下述之 HPLC 方法分析。

### (五) 以固定化菌發酵微藻水解液以生產生質酒精

#### 1. 固定化菌顆粒之製備

將 *S. cerevisiae* Wu-Y2 依上述培養方法進行第一次活化培養 48 小時後，將第一次活化的培養液以 10 % (v/v) 接入 1L 的培養基中，並隨時取點直到菌株培養至穩定其後，在 4°C 離心 (6000 rpm) 10 分鐘後，將上清液倒掉後將所獲得之菌體與經過高溫高壓滅菌並冷卻至室溫之 9 % 聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 與 1 % (1g, 總體積 100 mL) 海藻酸鈉 (Sodium Alginate) 溶液混合後再滴入硼酸 (50 g/L) 與氯化鈣 (50 g/L) 混合溶液中製備成顆粒，固定化菌顆粒以 4°C 之無菌水清洗後，置入冰箱以磷酸二氫鉀攪拌 24 小時，後再以 4°C 之無菌水清洗。

#### 2. 固定化菌發酵微藻水解液

經無菌水清洗後之固定化菌顆粒，放入培養基 (10 g/L

yeast extract, 10 g/L peptone, 20 g/L glucose) 並在 30°C, 培養 48 h 後將固定化菌顆粒 10% (w/v) 置入含 300 mL 上述微藻水解液之 500 mL 三角錐形瓶中, 於 30°C 靜置培養 48 小時。酒精、單糖之變化情形以下述之 HPLC 方法分析。

### 3. 分析方法

本研究以高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatograph, HPLC) 分析, 管柱為 Transgenomic IC Sep ICE-ORH-801 (6.5 mm×300 mm), 以 RI 偵測器 (BISCHOFF), 在 65°C 下進行分析。沖提液為 0.0025N 硫酸水溶液, 流速為 0.6 mL/min, 樣品注入體積為 20 μL。將水解液或發酵液做適當的稀釋後注入 HPLC, 對照醣類與酒精標準品之檢量線即可得到各種單醣之濃度與酒精生產濃度。

## 三、結果與討論

### (一) 微藻的成份組成

以乾基重計算微藻的成份 (表 1), 微藻含有粗蛋白 9.70%, 粗脂肪 6.57%, 粗灰份 18.26%, 碳水化合物 65.47%,

以碳水化合物減去粗纖維 3.00%, 計算微藻的海藻多醣含量為 62.47%, 顯示碳水化合物中主要組成為海藻多醣, 有利於做為發酵生產的原料。本研究探討不同水解方式處理以獲得最佳水解成單醣的條件, 以做為之後發酵成生質酒精的原料。

### (二) 高濃度強酸萃取微藻醣類之影響

微藻先以 3.6 N HCl, 121 °C, 進行多醣水解 50 分鐘, 如表 2 顯示, 微藻以 200 倍體積的酸液水解多醣可得到較高含量的單醣萃取液, 葡萄糖產率為 0.8% (葡萄糖濃度為 0.04 g/L), 半乳糖產率為 35.4% (濃度為 1.8 g/L)、阿拉伯醣產率為 10.6% (濃度為 0.53 g/L)。雖然單醣水解產率佳, 但因以強酸進行水解其單醣水解液 pH 值太低, 難以應用於後續發酵生產生質酒精, 若刻意將 pH 調回適合菌株生長的 pH 範圍, 則需數倍體積之 NaOH 溶液才可調整至適宜之 pH, 對於生產成本及生產環境皆有不利之影響, 故後續將尋找替代之水解方式, 進行藻類的水解。

表 1. 微藻主要成份和藻體多醣的含量

樣品 Sample	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude fat	粗灰份 Crude ash	粗纖維 Crude fiber	碳水化合物 Carbohydrate	海藻多醣 Deduced algal polysaccharide
微藻藻體	9.70 %	6.57 %	18.26 %	3.00 %	65.47 %	62.47 %

表 2. 高濃度強酸水解微藻-不同固液比的影響

微藻粉: 鹽酸 Microalgae powder : HCl (w/v)	葡萄糖濃度 Glucose Con (g/L)	葡萄糖產率 Glucose production yield (%)	半乳糖濃度 Galactose Con. (g/L)	半乳糖產率 Galactose production yield (%)	阿拉伯醣濃度 Arabinose Con. (g/L)	阿拉伯醣產率 Arabinose production yield (%)
1:10	1.44	1.4	4.87	4.9	1.27	1.3
1:20	1.74	3.5	2.53	5.1	0.95	1.9
1:40	0.80	3.2	2.15	8.6	0.75	3.0
1:60	0.37	2.2	1.96	11.8	0.62	3.7
1:80	0.22	1.8	1.90	15.2	0.62	4.9
1:100	0.10	1.0	1.84	18.4	0.56	5.6
1:200	0.04	0.8	1.77	35.4	0.53	10.6

水解條件: 把 2 克的微藻 (*Chlorella* sp. Y8-1) 粉末加入不同體積 (20 ml-400 ml) 之 3.6 N HCl 溶液中, 並於滅菌釜 121 °C 中進行酸水解 50 分鐘。產率為 [糖之濃度 (g/L) 除以微藻之濃度 (g/L)] x 100%; 微藻粉: 鹽酸比例 1:10、1:20、1:40、1:60、1:80、1:100、1:200, 相當於微藻濃度為 100g/L、50g/L、25g/L、16.7 g/L、12.5/L、10g/L、5g/L。

### (三) 以連續酸/酵素水解糖化微藻

#### 1. 稀酸處理對微藻水解糖化的影響

本實驗探討不同濃度稀酸在高溫高壓(滅菌釜中)水解微藻之影響。本方法主要希望藉由稀酸進行些微破壞藻類細胞壁,以提升海藻多醣的萃取率。結果如表 3 所示,顯示微藻以 0.1 N、0.3 N、0.5 N 稀酸經由高溫高壓的方式萃取海藻多醣 30 分鐘後之產率皆不甚高,雖然在較高濃度之產率較低濃度稍高,但 0.3 N、0.5 N 硫酸溶液與 0.1 N 硫酸溶液所使用的硫酸濃度相比多了 3 至 5 倍,往後若進行酵素水解或酒精發酵困難度會增加,故以 0.1 N 硫酸為最佳,並以此濃度進行後續之實驗。

#### 2. 高溫高壓處理時間對微藻水解糖化的影響

微藻粉置入 0.1 N 稀酸,再經由高溫高壓處理不同時間(10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min),其水解糖液以 HPLC 分析,再以檢量線推算出其分解之單醣濃度,並以單醣濃度及微藻濃度推算出單醣產率。微藻萃取結果如表 4 所示,經處理 60 min 後,葡萄糖(glucose)產率為 0.90% (濃度為 0.18 g/L),半乳糖(galactose)產率為

9.07% (濃度為 1.81 g/L),其他單糖則沒偵測到。

#### 3. 酵素水解對微藻水解糖化的影響

所有預處理方法之中,稀酸預處理因為有效且便宜而被廣泛研究,稀硫酸前處理可以有效的將可溶性半纖維轉為單糖(阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、木糖),因而可增加後續之轉換 [1]。由上述以稀硫酸進行前處理微藻可獲得單糖總產率為 9.97%,但根據上述微藻的成份組成分析發現微藻(*Chlorella* sp. Y8-1)之碳水化合物(粗纖維與海藻多糖)為 65.47%,因此稀酸預處理尚不足以將單糖完全釋出,故探討添加水解酵素(1%、2%、4%、6%及 8%)以增加單糖釋出率。如圖 1 所示,酸水解後添加酵素在 50°C, 100 rpm 環境下進行酵素水解,酵素水解 12 小時後發現酵素作用主要在於增加葡萄糖之產率,纖維雙醣與半乳糖的部分幾乎沒有增加,葡萄糖產量最高為添加 8% 酵素時,其產量為 3.3 g/L (16.5%),但與添加 1% 酵素之產量(1.5 g/L, 7.5%)相比只提高了 2.2 倍,但酵素量使用量是 8 倍,故成本考量往後實驗以 1% 酵素量為水解 *Chlorella* sp. Y8-1 的主要的添加酵素量。

表 3. 不同稀酸濃度對水解微藻的影響

硫酸濃度 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (N)	葡萄糖濃度 Glucose Con. (g/L)	葡萄糖產率 Glucose yield (%)	半乳糖濃度 Galactose Con. (g/L)	半乳糖產率 Galactose yield (%)
0.05	0.11	0.56	0.36	1.78
0.1	0.14	0.68	1.09	5.45
0.3	0.15	0.77	0.96	4.80
0.5	0.30	1.48	1.40	7.10

水解條件:把 2 克的微藻(*Chlorella* sp. Y8-1)粉末加入 100ml 之不同硫酸濃度(0.05N、0.1N、0.3N、0.5N)之溶液中,並於滅菌釜 121 °C 中進行酸水解 30 min。產率為[糖之濃度(g/L)除以微藻之濃度(20 g/L)]x100%。

表 4. 不同稀酸處理時間對水解微藻的影響

時間 Time (min)	葡萄糖濃度 Glucose Con. (g/L)	葡萄糖產率 Glucose yield (%)	半乳糖濃度 Galactose Con. (g/L)	半乳糖產率 Galactose yield (%)
10	0.17	0.84	1.10	5.52
20	0.14	0.70	1.07	5.38
30	0.15	0.75	1.19	5.97
40	0.15	0.74	1.24	6.19
50	0.16	0.78	1.54	7.69
60	0.18	0.90	1.81	9.07

水解條件:把 2 克的微藻(*Chlorella* sp. Y8-1)粉末加入 100ml 0.1N 硫酸溶液中,並於滅菌釜 121 °C 中進行不同時間(10min、20min、30min、40min、50min、60min)之酸水解。產率為[糖之濃度(g/L)除以微藻之濃度(20 g/L)]x100%。

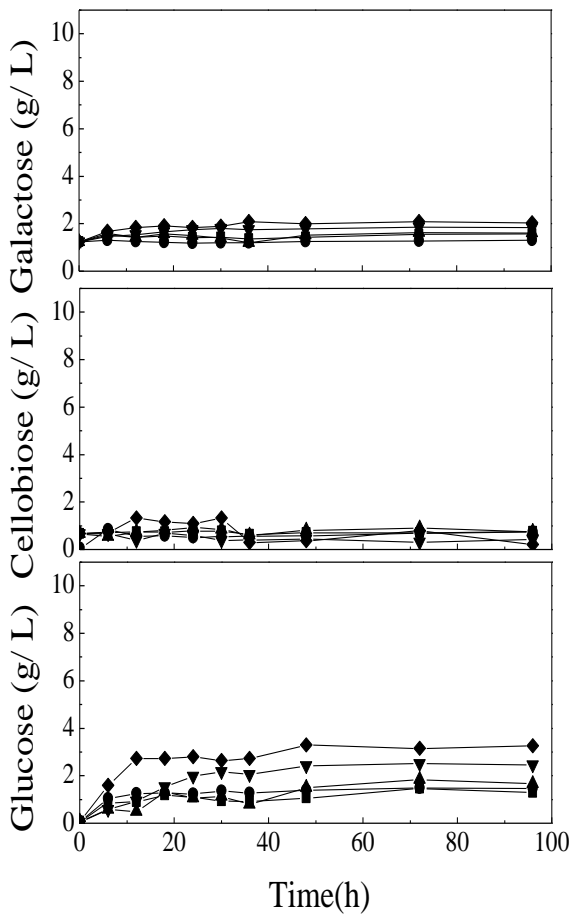


圖 1. 不同酵素量對於微藻 *Chlorella sp. Y8-1* 水解之影響

Enzyme (%) : (■) 1 ; (●) 2 ; (▲) 4 ; (▼) 6 ;  
(◆) 8

#### 4. pH 對以酵素水解糖化微藻的影響

纖維水解酵素的處理條件中，pH 值為影響水解效率的重要因素之一，大部分的纖維水解酵素最適反應 pH 值範圍條件為 4-5 [7]。本實驗探討 pH 對於酵素水解微藻之影響，微藻粉經由上述稀酸預處理後再調整至不同 pH (blank、2、3、4、4.5、5、6、7、8)，其中 blank 即 pH 在稀酸預處理後無加以調整，pH 調整後加入 1% 酵素，在 50°C，100 rpm 環境下進行酵素水解反應 12 小時，結果如表 5 與圖 2 所示，發現酵素對於葡萄糖產率之增加效果非常顯著，對纖維雙醣與半乳糖產率之增加效果不顯著，最佳的水解效果在 pH 5，葡萄糖產率為 26.2% (產量 5.23 g/L)，半乳糖產率為 9.5% (1.90 g/L)，纖維雙醣產率為 5.8% (1.16 g/L)。

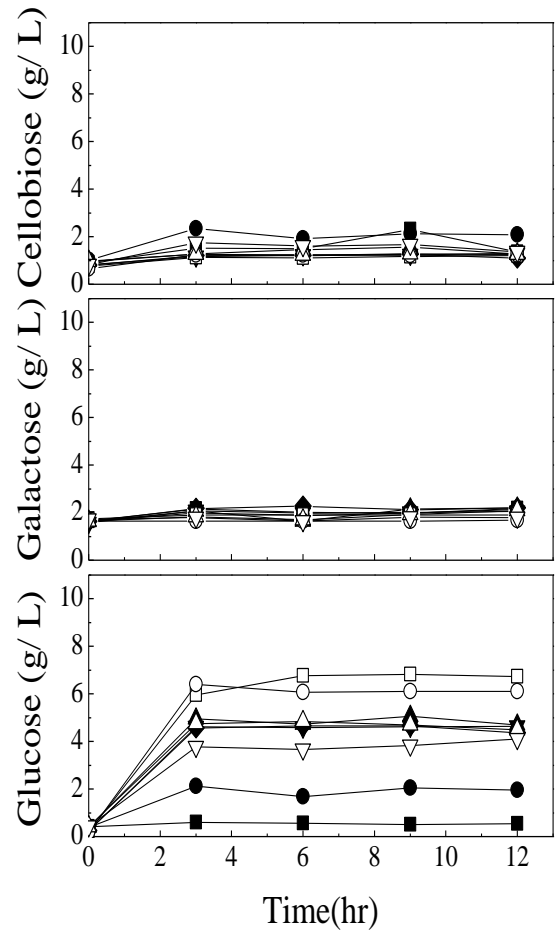


圖 2. pH 對於酵素水解微藻 *Chlorella sp. Y8-1* 之影響

pH : (■) Blank ; (●) 2 ; (▲) 3 ; (▼) 4 ; (◆) 4.5 ;  
(□) 5 ; (○) 6 ; (△) 7 ; (▽) 8

#### 5. 微藻之藻粉量對以酵素水解糖化微藻的影響

本實驗添探討加不同克數之微藻藻粉 (2g、4g、6g、8g、10g) 對於酵素水解糖化的影響，微藻液 (20 g/L、40 g/L、60 g/L、80 g/L、100 g/L) 經由上述稀酸預處理後再調整至 pH 5 後加入 1% 酵素反應 12 小時，結果如表 6 所示，當藻粉量添加越多時醣類濃度會增加，但是產率反而降低，如 10g 藻粉 (濃度 100 g/L) 經反應後醣類總產率為 9.23% (醣類總量 9.2 g/L)，2g 藻粉 (濃度 20 g/L) 經反應後醣類總產率 44.6% (醣類總量 8.92 g/L)，兩者總產率相差 4.8 倍，故往後實驗以 2g 的藻粉 (濃度 20 g/L)，固液比 1:50 為最適。

由以上實驗數據發現最適微藻水解糖化條件係將微藻藻粉經由固液比 1:50 的 0.1 N 硫酸溶液，高溫高壓 (121°C、2 atm) 進行酸水解一小時，冷卻至室溫後調整至 pH 5，加

## 吳芳禎、廖易濬、王曼瑩、施英隆：以微藻類水解液生產生質酒精

入 1 % (v/v) 酵素後置於 50°C，100 rpm 反應 12 個小時，可得葡萄糖產率為 25.9% (濃度為 5.19 g/L)，半乳糖產率為 8.3% (濃度為 1.65 g/L) 與纖維雙醣產率為 10.4% (濃度為 2.08 g/L)。最近我們實驗室也已成功的利用連續酸/酵素之水解法水解糖化巨藻 (龍鬚菜)，結果顯示龍鬚菜經由稀酸前處理 (0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，121°C、2atm、60min) 後，再加入 1

%纖維水解酵素 (pH 4.5、50 °C、100 rpm) 反應 6 小時可得到葡萄糖 6.30 g/L (產率 31.5%) 與半乳糖 5.60 g/L (產率 27.8%)，實驗證實 *S. cerevisiae* Wu-Y2 可利用此龍鬚菜水解液生產酒精 [21]。因此本研究亦探討以微藻 (*Chlorella* sp. Y8-1) 之水解液為碳源並以懸浮與固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 發酵微藻水解液以生產生質酒精。

表 5. 不同 pH 對酵素水解微藻之影響

pH	Glucose (g/L)	Glucose production yield (%)	Galactose (g/L)	Galactose production yield (%)	Cellobiose (g/L)	Cellobiose Production yield (%)
Blank	0.57	2.9	2.01	10.5	1.50	7.5
2	1.68	8.4	1.90	9.5	1.94	9.6
3	4.73	23.7	1.65	8.3	1.47	7.4
4	4.59	23.0	1.98	9.9	1.24	6.2
4.5	4.66	23.3	2.27	11.4	1.21	6.0
5	5.23	26.2	1.90	9.5	1.16	5.8
6	5.20	25.8	1.65	8.3	1.25	6.2
7	4.84	24.1	1.70	8.5	1.22	6.1
8	3.60	18.3	1.65	8.2	1.62	8.1

反應條件：2 克的微藻 (*Chlorella* sp. Y8-1) 粉末加入 100ml 0.1N 硫酸溶液，再於高壓滅菌釜 (121°C) 進行酸水解 60 min，之後調整至不同 pH，加入纖維酵素 (1 %，w/w)，於 50°C、100 rpm 反應 12 小時。產率為[糖之濃度(g/L)除以微藻之濃度(20 g/L)]x100%。

表 6. 不同微藻藻粉量對酵素水解微藻之影響

藻粉量 (g/L)	Glucose (g/L)	Glucose production yield (%)	Galactose (g/L)	Galactose production yield (%)	Cellobiose (g/L)	Cellobiose Production yield (%)
20	5.19	25.9	1.65	8.3	2.08	10.4
40	5.27	13.2	2.10	5.3	2.20	5.5
60	5.30	8.8	1.30	2.2	1.8	3.0
80	4.10	5.1	1.30	1.6	1.8	2.3
100	6.24	6.2	0.83	0.8	2.16	2.2

反應條件：不同量的微藻 (*Chlorella* sp. Y8-1) 粉末 (2g-10g) 加入 100ml 0.1N 硫酸溶液，再於高壓滅菌釜 (121°C) 進行酸水解 60 min，之後調整至 pH 5，加入纖維酵素 (1 %，w/w)，於 50 °C、100 rpm 反應 12 小時。產率為[糖之濃度 (g/L) 除以微藻之濃度 (g/L)] x100%。

#### (四)以 *S. cerevisiae* Wu-Y2 懸浮菌株發酵微藻水解液以生產生質酒精

以微藻水解單醣為碳源，並添加 2 g/L Yeast extract 配製成生產培養基後，將 *S. cerevisiae* Wu-Y2 於前活化培養基 (20 g/L 碳源、10 g/L Yeast extract) 活化 48 小時後，取 10% (v/v) 至 100 mL 生產培養基中，靜置培養 48 小時。結果如圖 3 所示，*S. cerevisiae* Wu-Y2 可快速完全消耗葡萄糖，而半乳糖之消耗速率較慢，且本菌株無法利用纖維雙醣當作碳源。此結果與文獻之報導相似 [9]，已知雖然 *S. cerevisiae* 可同時利用葡萄糖及半乳糖，但葡萄糖較半乳糖之消耗快，呈現雙峰延遲 (diauxic lag period) 現象。發酵 48h 後消耗單醣量總和為 7.53 g/L 並產生 3.61 g/L 酒精，其單糖轉化成酒精之轉化率為 94%。我們之前發酵龍鬚菜水解液生產酒精 [21]，發現 *S. cerevisiae* Wu-Y2 以懸浮培養亦能有效轉換龍鬚菜水解醣，可獲得 4.7 g/L 生質酒精 (酒精轉換率 94%)，因此 *S. cerevisiae* Wu-Y2 可適用於巨藻與微藻之水解液，並有效率的將其轉化為生質酒精。

#### (五)以 *S. cerevisiae* Wu-Y2 固定化菌株發酵微藻水解液以生產生質酒精

以微藻水解單醣為碳源，並添加 2 g/L Yeast extract 配製成培養基後，接入 10% (w/w) 之固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 顆粒，並在 30°C，靜置培養 48 小時後，結果如圖 4 所示，與上述之懸浮培養相比較，以固定化顆粒培養的糖類消耗與酒精產量均與懸浮培養相似，其消耗單醣量總和為 7.35 g/L 並產生 3.50 g/L 酒精，微藻水解之單糖轉化成酒精之轉化率為 93%。雖然本研究之系統可成功將藻類水解液以高轉換率 (高達 93%) 生成生質酒精，但無可否認低酒精濃度 (3.50 g/L) 將不利於後續之分離程序，增加製造成本。為提升酒精濃度，提高水解微藻所產生之微藻液中可發酵單糖之濃度應有助於後續酒精濃度之提升，後續研究將針對此方面再加強。另外，由於微藻之高固碳能力，未來考量微藻生質酒精之成本效益，除製造成本外，亦應考量碳權之收益。微藻可快速生長且 1 噸海藻 (溼重計) 可以出售 2 噸的二氧化碳之碳權配額，因此以微藻生產生質酒精之技術仍是值得開發 [6]。

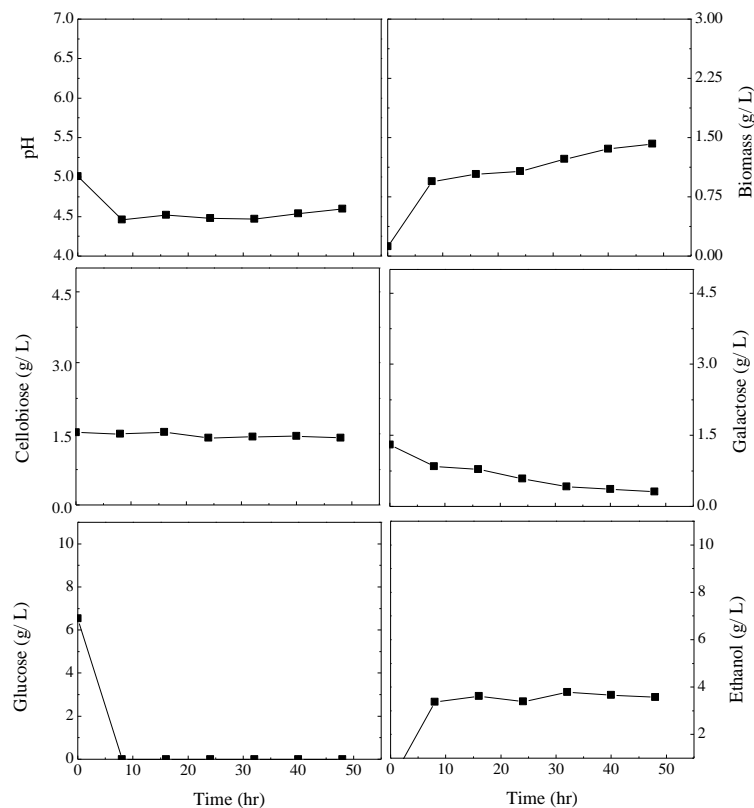


圖 3. 以懸浮 *S. cerevisiae* Wu-Y2 發酵微藻水解液生產生質酒精



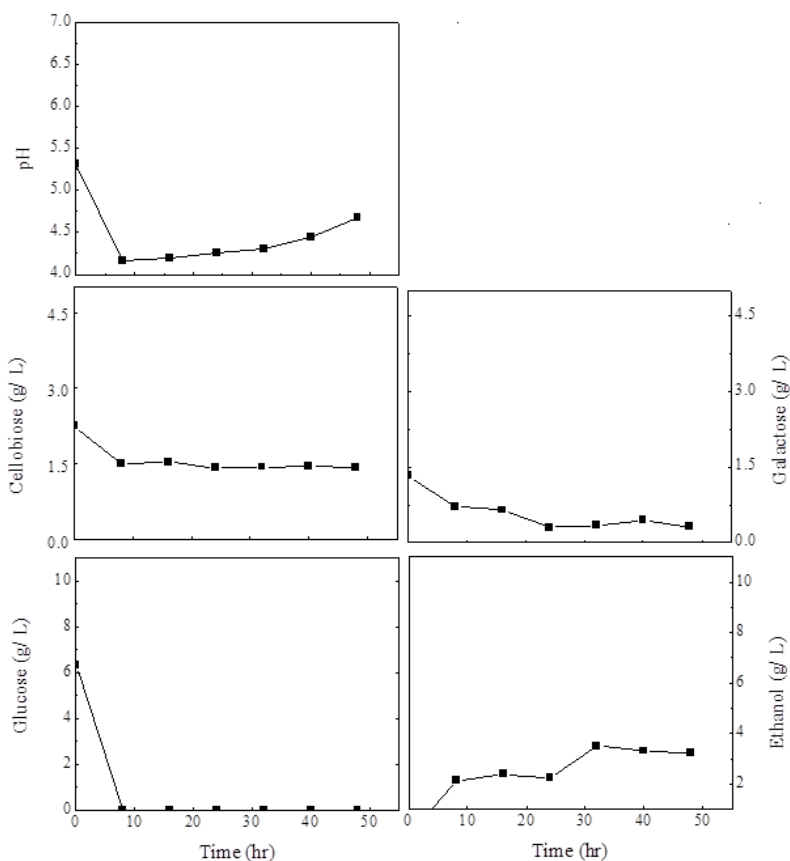


圖 4. 以固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 發酵微藻水解液生產生質酒精

#### 四、結論

本研究完成使用自篩選之微藻進行探討稀酸水解，包括探討 $H_2SO_4$ 濃度、時間等影響水解之因子，之後並以生化方法進行水解，探討纖維分解酵素在不同酵素量、反應時間、pH、藻粉量對微藻藻粉水解之最適條件。本研究發現在最佳的稀酸水解條件下，可獲得單醣類共9.9%；在酵素水解作用下，微藻可水解出25.9%的葡萄糖，8.3%的半乳糖與10.4%的纖維雙醣。以微藻水解之單醣當作碳源，並添加2 g/L Yeast extract 配製成培養基後，利用 *S. cerevisiae* Wu-Y2，在30°C，靜置培養48小時，實驗證實*S. cerevisiae* Wu-Y2可利用藻醣生產生質酒精，微藻水解之單醣轉化成酒精之轉化率為93%。本研究證實利用連續稀酸/酵素之水解方式與使用 *S. cerevisiae* Wu-Y2發酵可有效以微藻 *Chlorella* sp. Y8-1為生質原料來生產生質酒精，在生質能源之發展具有相當大的潛力。

#### 誌謝

本研究誠摯感謝科技部計畫提供相關經費支援(計畫編號：NSC 100-2632-B-212-001-MY3)，使得本研究得以順利進行，謹此致謝。

#### 參考文獻

1. 林則施 (民 97)，利用微生物將纖維素廢棄物轉化為生質酒精，大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
2. 廖易濬 (民 103)，以藻類生質生產生質酒精之研究，大葉大學環境工程學系碩士論文。
3. Balat, M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858-875.
4. Buck, B. H. and C. M. Buchholz (2004) The offshore-ring: a new system design for the open ocean aquaculture of macroalgae. *Journal of Applied Phycology*, 16(5), 355-368.

5. Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306.
6. Fan, C. C., Y. L. Lee, Y. W. Lu and C. H. Wu (2009) Algal polysaccharides extraction and algal residues. *Journal of Taiwan Fisheries Research*, 17(1), 81-91.
7. Galbe, M. and G. Zacchi (2002) A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(6), 618-628.
8. González-Fernández, C. and M. Ballesteros (2012) Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnology Advances*, 30 (6), 1655-1661.
9. Ha, S. J., Q. Wei, S. R. Kim, J. M. Galazka, J. H. Cate and Y. S. Jin (2011) Cofermentation of cellobiose and galactose by an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(16), 5822-5825.
10. Luning, K. and S. Pang (2003) Mass cultivation of seaweeds: current aspects and approaches. *Journal of Applied Phycology*, 15(2), 115-119.
11. Markou, G., I. Angelidaki and D. Georgakakis (2012) Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied microbiology and biotechnology*, 96 (3), 631-645.
12. Mata, T.M., A. A. Martins and N. S. Caetano (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232.
13. Nigam, P. S. and A. Singh (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52-68.
14. Park, J. H., J. Y. Hong, H. C. Jang, S. G. Oh, S. H. Kim, J. Y. Yoon and Y. J. Kim (2012) Use of *Gelidium amansii* as a promising resource for bioethanol: A practical approach for continuous dilute-acid hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 108, 83-88.
15. Rosenberg, J. N., G. A. Oyler, L. Wilkinson and M. J. Betenbaugh (2008) A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution, *Current Opinion in Biotechnology*, 19 (5), 430-436.
16. Sánchez, Ó. J. and C. A. Cardona (2007) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(13), 5270-5295.
17. Saxena, R. C., D. K. Adhikari and H. B. Goyal (2009) Biomass-based energy fuel through biochemical routes: a review. *Sustainable Energy Reviews*, 13(1), 167-178.
18. Singh, A., S. I. Olsen and P. S. Nigam (2011) A viable technology to generate third-generation biofuel. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(11), 1349-1353.
19. Subhadra, B. and M. Edwards (2010) An integrated renewable energy park approach for algal biofuel production in United States, *Energy Policy*, 38(9), 4897-4902.
20. Wi, S. G., H. J. Kim, S. A. Mahadevan, D. J. Yang and H. J. Bae (2009) The potential value of the seaweed Ceylon moss (*Gelidium amansii*) as an alternative bioenergy resource. *Bioresource Technology*, 100(24), 6658-6660.
21. Wu, F. C., J. Y. Wu, J. Y. Liao, M. Y. Wang and I. L. Shih (2014) Sequential acid and enzymatic hydrolysis *in situ* and Bioethanol production from *Gracilaria* biomass. *Bioresource Technology*, 156, 123-131.
22. Yoon, J. J., Y. J. Kim, S. H. Kim, H. J. Ryu, J. Y. Choi, G. S. Kim and M. K. Shin (2010) Production of polysaccharides and corresponding sugars from red seaweed. *Advanced Materials Research*, 93, 463-466.
23. Yun, E. J., M. H. Shin, J. J. Yoon, Y. J. Kim, I. G. Choi and K. H. Kim (2011) Production of 3, 6-anhydro-L-galactose from agarose by agarolytic enzymes of *Saccharophagus degradans* 2-40. *Process Biochemistry*, 46(1), 88-93.

收件：105.07.11 修正：105.10.05 接受：105.11.11