

# 以固定化酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 發酵龍鬚菜水解液以 生產生質酒精

吳芳禎<sup>1</sup> 廖易濬<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

近年來，由於石化燃料的使用造成環境汙染及溫室效應，因此尋找可替代性能源相當受到重視。台灣四面環海，擁有豐富的海洋資源，非常適合開發藻類生質能源。本研究探討以固定化菌發酵藻類水解液以生產生質酒精，發現固定化 *Saccharomyces cerevisiae* Wu-Y2 菌能有效的利用藻類水解液中之葡萄糖與半乳糖以生產酒精。使用龍鬚菜水解液，並添加 Yeast extract 2 g/L 為原料，固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌在 30°C 下靜置培養 48 小時，可獲得生質酒精 4.9 g/L (酒精轉化率 94%)，即 1g 的龍鬚菜藻粉中可產出 0.25g 的生質酒精。利用掃描式電子顯微鏡可有效觀察菌株在固定化顆粒的表面與內部之生長情形，證實利用固定化菌顆粒生產酒精的可行性。在搖瓶批次培養中固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌可有效的利用龍鬚菜水解醱類 (葡萄糖半乳糖) 以生產生質酒精，且經五個批次的培養，菌株完全無弱化的現象。經過五批次培養之酒精平均產量為 5.0 g/L，而每批次之酒精生產皆接近於理想轉化率 (98%)。以固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌於反應器中進行龍鬚菜水解醱類發酵生產酒精的探討發現接種 10% 菌量，連續饋料及靜置培養 (無曝氣) 為最適生產條件。在連續饋料的實驗中以 2.3mL/min 連續饋料 96h，共饋料 13.2L，酒精生產濃度平均為 4.1 g/L，可得到的酒精總量為 54.1g。因此以固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌發酵藻類水解液以生產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，固定化菌，批次發酵，連續饋料發酵，藻類水解液

## Fermentation of *Gracilaria* Hydrolysate for Bioethanol Production by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae*

FANG-CHEN WU<sup>1</sup>, YI-JYUN LIAO<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

The use of fossil fuels causes environmental pollution and contributes to the greenhouse effect. Growing concern regarding the rapid depletion of fossil fuels and global warming has motivated people to seek alternative energy sources. Algae are suitable materials for bioethanol production in Taiwan, particularly because Taiwan is surrounded by the ocean and has rich marine resources. This study was conducted to investigate the fermentation of algae hydrolysate by immobilized yeast for bioethanol production. The results showed that immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Wu-Y2 displayed excellent performance in the cofermentation of glucose and galactose present in algae hydrolysate. When the hydrolysate of *Gracilaria cliftonii* was fermented by immobilized *S. cerevisiae* Wu-Y2, a final ethanol concentration of 4.9 g/L (94% conversion efficiency) was achieved. Overall, 0.25 g of ethanol can be produced from 1 g of dry *Gracilaria* through this method. The growth of *S. cerevisiae* Wu-Y2 on the immobilized particles can be observed with a scanning electron microscope. Repeated batch fermentation revealed that the immobilized cells can be reused over five successive reaction cycles without any loss of biocatalytic activity. The average ethanol concentration was 5.0 g/L (more than 98% conversion efficiency in every cycle). Fermentation of *Gracilaria* hydrolysate by using immobilized *S. cerevisiae* Wu-Y2 in a bioreactor revealed that suitable conditions for ethanol production include the addition of 10% immobilized cells, continuous back-feeding, and rest cultivation (with no aeration). When the fermentation was conducted through continuous feeding of hydrolysate at 2.3 mL/min for 96 h, an overall 13.2 L of hydrolysate was added, the average ethanol concentration was 4.1 g/L, and 54.1 g of ethanol was obtained. The findings of this study revealed that *Gracilaria* sp. can be a potential feedstock in biorefineries for ethanol production by using immobilized *S. cerevisiae*.

**Key Words:** Bioethanol, immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, batch fermentation, Continuous feedback fermentation, *Gracilaria cliftonii* hydrolysate

## 一、前言

過去數十年由於世界各國人口遽增加上工業發展，使石化燃料迅速消耗。石化燃料屬於非再生能源且使用的同時也造成嚴重之環境汙染、溫室效應及地球暖化的問題。在此能源危機與環保問題之多重壓力下，因此研究開發新的替代性能源是現今最被重視的議題。再生能源中生質燃料的開發受到相當的重視，以生質柴油與生質酒精最受到注意[10]。

生質酒精可由多種可再生原料發酵生產，因此可視為一種清潔及再生能源，它是目前再生能源中最受重視且是取代石油最理想之替代燃料。但是第一代生質酒精之生產完全是以糧食作物為原料，而栽種這些作物需要廣大的栽種面積，連帶會造成森林砍伐、糧食短缺及物價上漲等問題[9]。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]。

除以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[8, 11, 13-14]。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）[5]。由於藻類能夠有效固定CO<sub>2</sub>，因此利用藻類來固定工業排放廢氣中CO<sub>2</sub>的方法，不但可減少溫室氣體（green house gas, GHG）的排放，進而可達到減碳的目的，相當具有潛力[7]。因為藻類容易適應生長環境，可生長於淡水或海水中的，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），將這些多醣降解成簡單的單醣後可進而發酵產生酒精[2]。最近我們實驗室探討藻類生質之應用並已成功的發展一種可將藻類 *Gracilaria cliftonii* 有效水解的方法； *Gracilaria cliftonii* 經由稀酸水解（0.1N  $H_2SO_4$ 、131°C、60min）後，再加入1%纖維素水解酵素（pH4.5、50°C、100rpm）反應6小時後可得到6.3 g/L 葡萄糖（產率31.5%）與5.6 g/L 半乳糖（產率27.8%）[12]。本研究探討以固定化菌方式發酵此藻類水解液以生產生質酒精之最佳條件。

## 二、材料與方法

### (一)菌種：

本實驗使用之酒精生產菌株 *Saccharomyces cerevisiae* Wu-Y2，篩自於水果酒工廠的淤泥[12]。

### (二)培養基與培養方法：

配取 100mL 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。

### (三)以固定化菌發酵藻類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後，在 4°C 離心（6000rpm）10 分鐘，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 100mL）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 之無菌水清洗後。

#### 2. 固定化菌發酵藻類水解液

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 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。菌體生長量（bulk biomass）即為每升發酵液中之乾菌種，其分析法依據文獻之方法[12]，另外上述藻類水解液係由購自雲林至七湖一帶外海所培養之龍鬚菜，經由我們實驗室開發之水解方法所製備之樣品[12]。

#### 3. 填充床反應器設計與操作

本實驗為了提高發酵效率，而設計了填充床反應器（如圖 1），將固定化菌株置於填充床反應器中，並探討不同顆粒添加量、曝氣量、連續饋料與批次發酵等。顆粒添加量依體積添加不同比例的顆粒（5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%），置於反應器，再加入生產培養基（龍鬚菜水解液 300 mL、Yeast extract 2 g/L），培養 48 小時，並定時取點，分析 pH 變化、醱類的消耗與酒精的生產。曝氣量實驗中，探討以曝氣方試增加質能的傳遞來增加酒精的生產速度

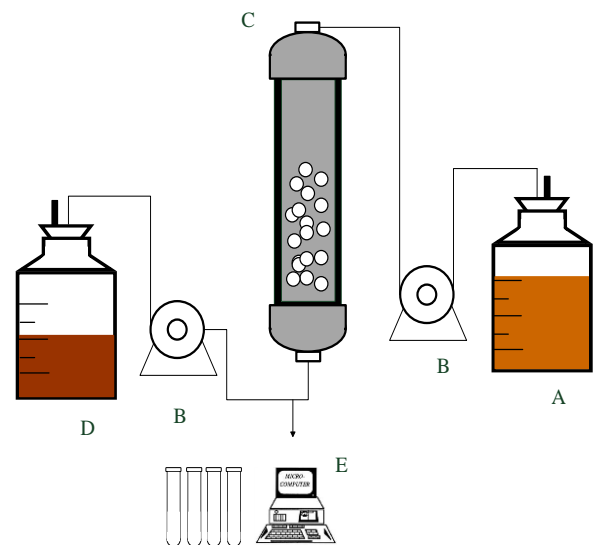


圖 1. 反應器示意圖

A: 生長培養基; B: 蠕動幫浦; C: 反應器(填充床): 6cm×25cm, 總體積 600mL; D: 已發酵液; E: 採樣與分析



將生產培養基(300 mL 龍鬚菜水解液、Yeast extract 2 g/L) 再加入 0.5% 消泡劑，再接入 10% 包覆固定化顆粒，以浮子流量計控制不同曝氣量(0 L/min、2 L/min、5 L/min、8 L/min、10 L/min) 培養 48 小時，且定時取點分析 pH 變化、醴類的消耗與酒精的生產。

#### 4. 分析方法

本研究以高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, 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 0.0025 N 硫酸水溶液，流速為 0.6 mL/min，樣品注入體積為 20 μL。將發酵液做適當的稀釋後注入 HPLC，對照醴類與酒精標準品之檢量線即可得到各種單醴之濃度與酒精生產濃度。酒精轉化率 (%) = 酒精產率/酒精理想產率，其中酒精產率 (g EtOH/ g sugar) = 酒精產生濃度/總單糖消耗濃度，而酒精理想產率為 0.51g EtOH/ g sugar。

#### 5. 電子顯微鏡觀察固定化系統培養 *S. cerevisiae* Wu-Y2 之生長情形

本實驗在不同培養時間，對 *S. cerevisiae* Wu-Y2 之顆粒進行掃描電子顯微鏡 (Scanning Electron Microscope, SEM) 拍攝，以觀察 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌株在固定化顆粒的表面與內部生長情形。將不同培養時間 (0 day~7 day) 之固定化顆粒，以無菌水清洗，除去殘留的培養基，再置於 5% 戊二醛溶液中進行細胞的骨架固定 3-4 小時，隨後由低至高循序漸進的方式置於不同濃度的酒精溶液中進行脫水，其每個濃度浸泡 30 min、重複兩次，最後以 99% 酒精浸泡 1 h、重複兩次後，以超臨界流體乾燥，完成後放置乾燥箱保存備用。在拍 SEM 前需將樣品置於離子覆膜機中鍍上一層金後，利用掃描式電子顯微鏡，以不同倍數觀察拍攝並紀錄菌株於固定化顆粒上的生長情形。

### 三、結果與討論

#### (一) 以懸浮與固定化菌發酵龍鬚菜水解液生產生質酒精

龍鬚菜依我們先前發現之最適水解條件[12]進行水解後煮沸 (15 min, 100°C) 使酵素失活，再以濾布 (300 目) 過濾除去藻渣，並加入 Yeast extract 2 g/L 經過高溫高壓滅菌後配置成培養基。將培養基放置室溫冷卻後，接入 10% (w/w) 已活化之 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌株，進行懸浮培養與固定化系統培養。結果如圖 2 所示，懸浮培養與固定化顆

粒培養初始 pH 分別為 4.65 與 5.11 而在 8 小時後 pH 趨近於穩定，均降至 4.15 左右，初始 pH 之不同推測是因為在懸浮培養時接入了 10% 的活化培養基於生產培養基中，而固定化顆粒則是以無菌水沖洗後直接加入生產培養基，故懸浮培養的初始 pH 比固定化系統的 pH 來的低。在糖類消耗方面，懸浮培養與固定化系統的消耗情形相同，葡萄糖與半乳糖初始濃度分別為 6.25 g/L 與 5.5 g/L，而葡萄糖在 8 小時消耗完畢，半乳糖在 16 小時以後還剩餘 1.5 g/L 左右，酒精生產方面懸浮培養與固定化系統培養最高產量分別為 4.6 g/L 與 4.9 g/L，最大轉化率分別為 88% 與 94%。由於以固定化菌發酵之酒精產率明顯的較以懸浮菌發酵之酒精產率為佳，故以固定化系統進行後續的實驗探討。發酵期間以 HPLC 分析樣品 (圖 3)，由圖中可以看到葡萄糖 (retention time 6.8 min) 經 24 小時其波峰已經因消耗而消失並且產生酒精 (retention time 15 min) 的波峰，而半乳糖 (retention time 7.4 min) 的波峰則在經 48 小時因消耗而消失，由圖可清楚的看見單醴波峰在 48 小時已完全消失，而酒精的波峰有明顯的增加。

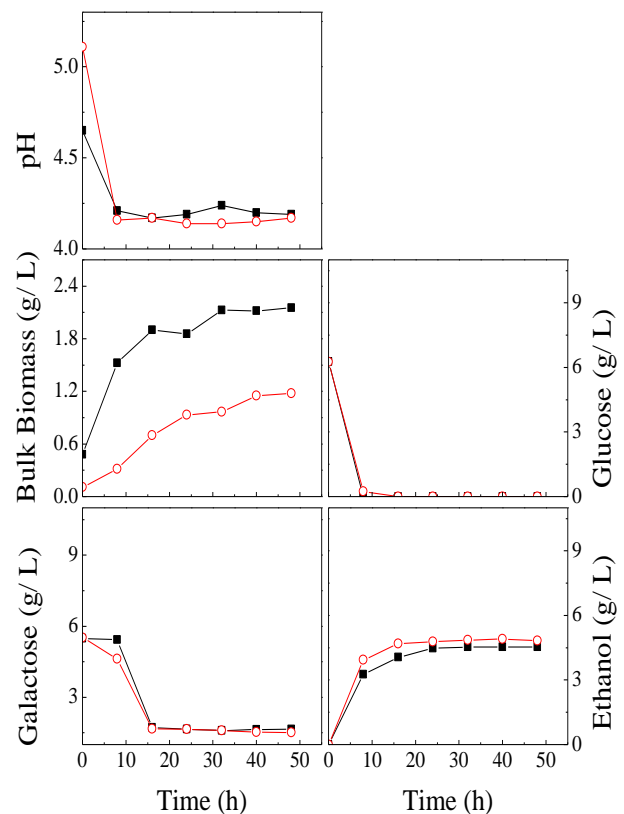


圖 2. 以龍鬚菜水解醴類以生產生質酒精

培養方式：(○) 固定化系統；(■) 懸浮培養





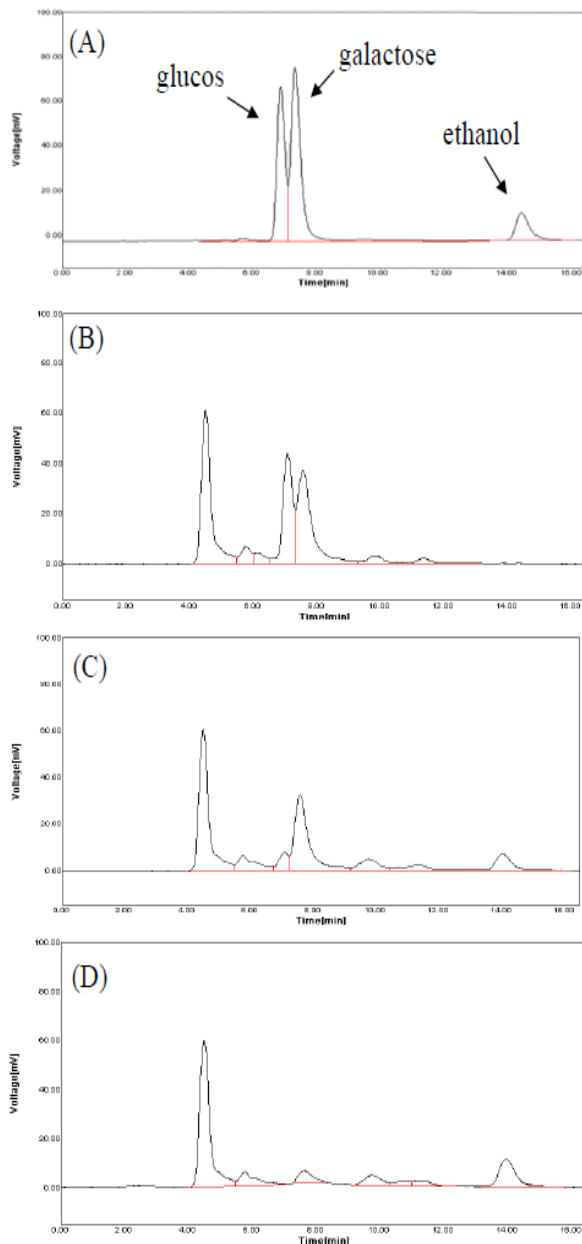


圖 3. 龍鬚菜水解單糖生產生質酒精之 HPLC 分析

- (A) 葡萄糖、半乳糖與酒精之標準品；
- (B) 以龍鬚菜水解液為原料生產酒精 0 h；
- (C) 以龍鬚菜水解液為原料生產酒精 24 h；
- (D) 以龍鬚菜水解液為原料生產酒精 48 h。

## (二) 固定化系統培養 *S. cerevisiae* Wu-Y2 之生長情形

本實驗在不同培養時間，對 *S. cerevisiae* Wu-Y2 之顆粒進行掃描電子顯微鏡 (Scanning Electron Microscope, SEM) 拍攝，以觀察 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌株在固定化顆粒的表面與內部生長情形。依圖 4-1 與圖 4-2 觀察發現，本實驗所使用之顆粒在初培養 (第 0 天) 的時候顆粒表面光滑 (A-0-1)，內部中心則有一個較大的孔洞，在表面則沒有發現菌株的分布 (C-0-1)，只有在內部出現少許菌株 (C-0-2)。在培養 1-3 天時如 A-1-1 與 A-3-1 所見菌株在顆粒表面生長快速，有不少的菌落在表面出現，但到了 5-7 天時 (A-5-1 與 A-7-1) 則發現表面的菌落減少了，且有發現菌株狀況不佳 (菌株中間凹陷) 的情況，猜測是碳源已消耗完畢，菌株互相競爭所致，但內部的菌株分布均勻，且狀況良好 (C-5-1 與 C-5-2；C-7-1 與 C-7-2)。

## (三) 以固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌進行批次發酵龍鬚菜水解液生產生質酒精

以固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌進行批次發酵龍鬚菜水解液生產生質酒精結果如圖 5 所示，Biomass 依批次順序在 48 小時分別為 1.0 g/L、1.1 g/L、1.0 g/L、1.1 g/L、1.0 g/L。葡萄糖在 8 小時皆消耗完畢，而半乳糖在 24 小時左右均殘留 1.5 g/L 左右，其酒精的產量與轉化率依批次順序在 48 小時分別為 5.0 g/L (98%)、5.3 g/L (98%)、4.9 g/L (98%)、4.9 g/L (98%)、5.0 g/L (97%)，利用龍鬚菜水解醴做為碳源進行批次培養，經過數次的批次實驗中，醴類均能被消耗利用，而酒精生產也都接近於理想轉化率，證實菌株並沒有弱化的現象，也有良好的酒精產量。

## (四) 以固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌在反應器發酵龍鬚菜水解醴以生產生質酒精

### 1. 反應器內顆粒添加量對生產生質酒精之影響

本實驗探討反應器內顆粒添加量對 *S. cerevisiae* Wu-Y2 生產生質酒精的影響。於六組反應器內各置入生產培養基 300 mL (龍鬚菜水解液 300 mL 及 Yeast extract 2 g/L)，再添加不同比例的固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 顆粒 (5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%) 於反應器後培養 48 小時，並定時取點，分析 pH 變化、醴類的消耗與酒精的生產。結果由圖 6 可發現，初始的醴類濃度，葡萄糖為 6.1 g/L，半乳糖為 5.3 g/L，酒精產量在添加顆粒量 10%-50% 時均差異不大，平均為 5.62 g/L (平均轉化率 98.4%)，而添加顆粒量 5% 在 48 小時酒精的產量只有 3.9 g/L，且半乳糖也沒有消耗完，



還殘留 1.6 g/L，由此結果可以發現在添加 10% 以上的固定化顆粒就有最高酒精產量（平均 5.6 g/L），若以更高添加量則酒精產量均為相同，故往後實驗以添加 10% 的固定化顆粒為最適顆粒添加量。黃新翔[1] 曾探討利用固定化菌株顆粒以提升酒精產量之研究，發現添加 50% 以上的顆粒酒精的產

量均相同，而本實驗只需要 10% 以上，推測是龍鬚菜水解醴的濃度較低，故只需要 10% 的顆粒添加量，且與文獻相同的是均有在管壁上發現白色的凝絮狀附著物，推測為固定化中的菌株因顆粒內生長環境已飽和而飄散至培養基中。

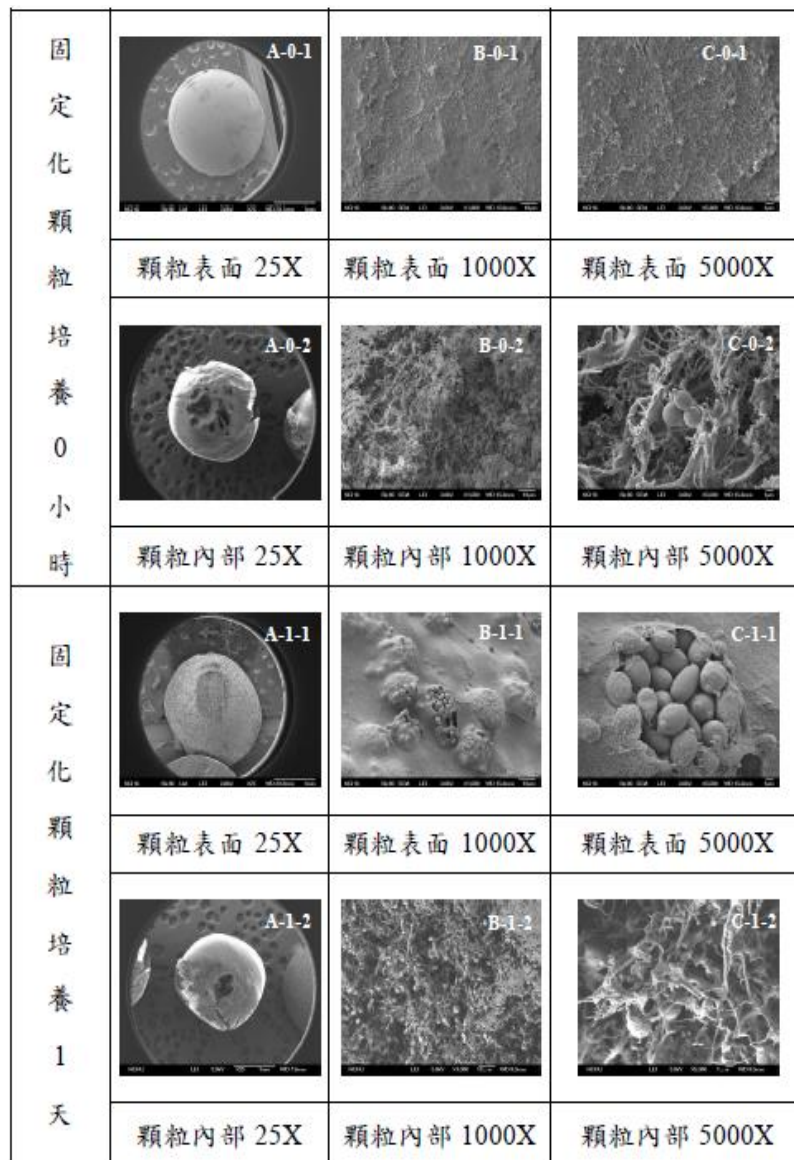
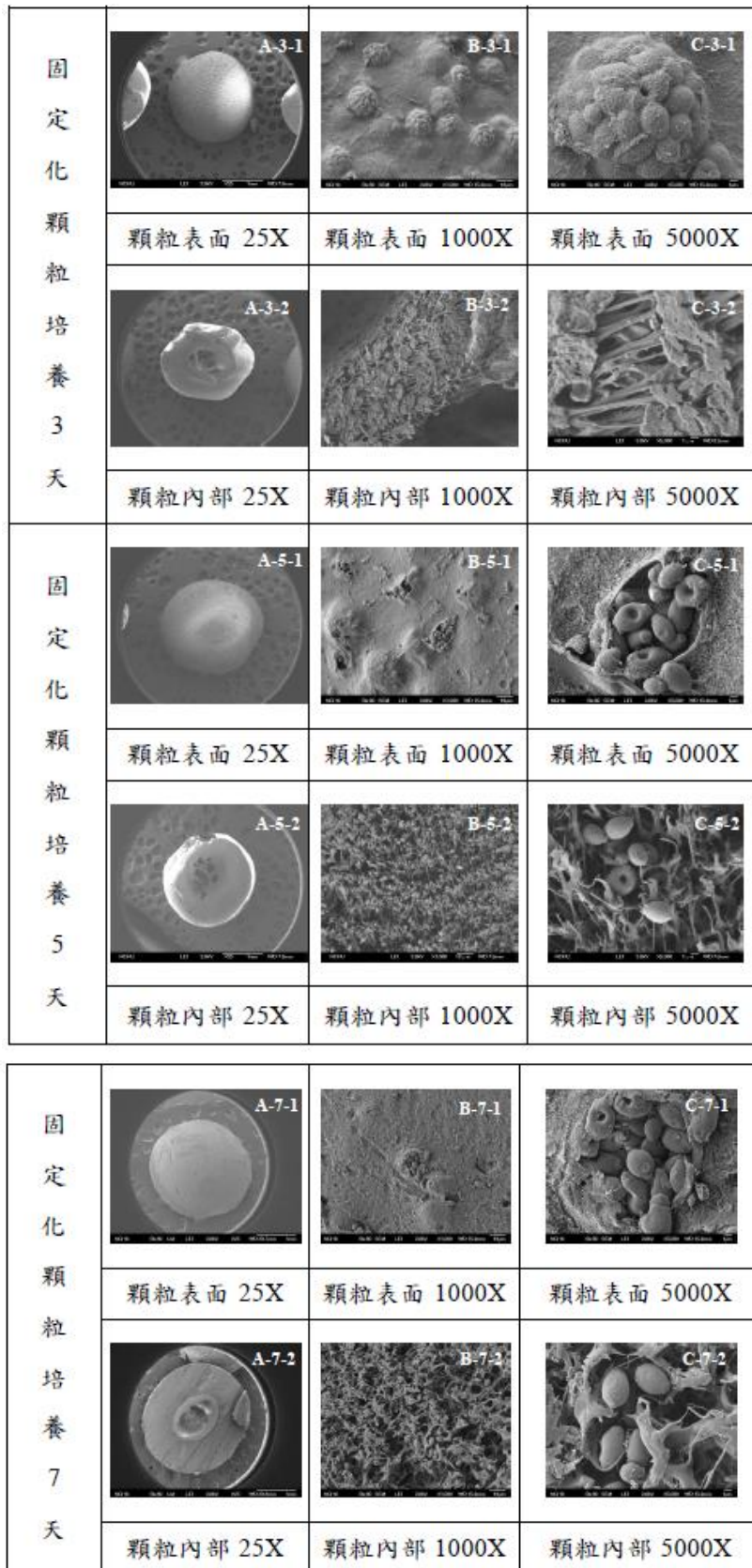


圖 4-1. 掃描式電子顯微鏡觀察 *S. cerevisiae* Wu-Y2 於固定化顆粒上之生長情形

圖 4-2. 掃描式電子顯微鏡觀察 *S. cerevisiae* Wu-Y2 於固定化顆粒上之生長情形

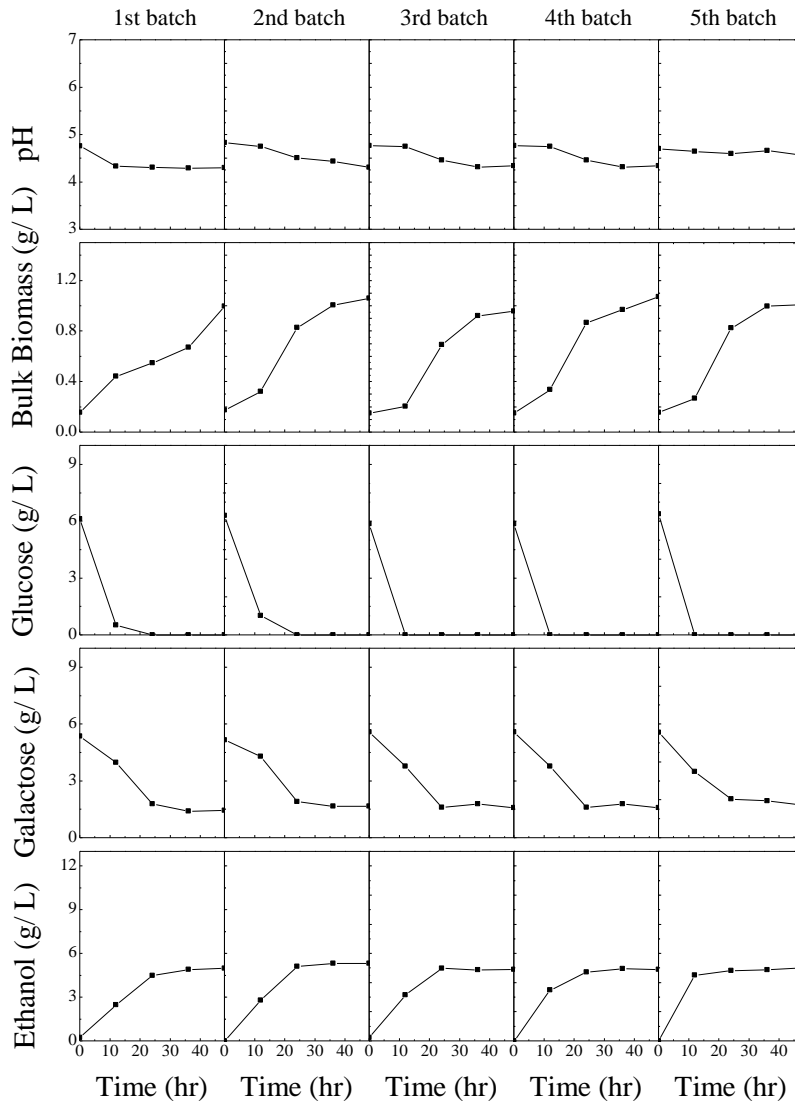


圖 5. 以固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌進行批次發酵龍鬚菜水解液生產質酒精

## 2. 反應器內曝氣量對生產質酒精之影響

本實驗所使用的酵母菌株為兼性好氧型的酵母菌，在一般的情況下酒精的發酵大多採用厭氧方式進行，而本實驗以固定化顆粒包覆 *S. cerevisiae* Wu-Y2 進行酒精的發酵並探討以曝氣方式增加質能的傳遞來增加酒精的生產速度。將生產培養基（龍鬚菜水解液 300 mL 及 Yeast extract 2 g/L）加入 0.5% 消泡劑，經高溫高壓滅菌釜後冷卻至室溫，再接入 10% 固定化顆粒，以浮子流量計控制不同曝氣量（0 L/min、2 L/min、5 L/min、8 L/min、10 L/min）並培養 48 小時，且定時取點分析 pH 變化、醴類的消耗與酒精的生產。結果如圖 7 所示，酒精的產量以靜置培養最高為 5.83 g/L（轉化率為 98%），曝氣量愈高酒精產量愈低，產量由高至低分別為靜

置 > 曝氣量 2 L/min (5.22 g/L) > 曝氣量 5 L/min (3.78 g/L) > 曝氣量 8 L/min (1.27 g/L) > 曝氣量 10 L/min (0 g/L)，在曝氣量 10 L/min 沒有發現酒精的生產。酵母菌的代謝可分為厭氧發酵與耗氧發酵，根據文獻酵母菌在好氧環境下細胞內會大量產生 ATP，使得細胞快速生長，而在厭氧的環境下細胞產生的 ATP 數量減少且開始生成酒精產物[6]。酵母菌在厭氧發酵時醴類的利用速率比有氧的環境下高，此現象在碳源不足的情況下更為明顯，但在碳源充足的情況下儘管是在好氧的環境下酵母菌也會停止呼吸作用而進行酒精發酵，本實驗發現靜置培養（無曝氣）對固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌生產酒精較適合。





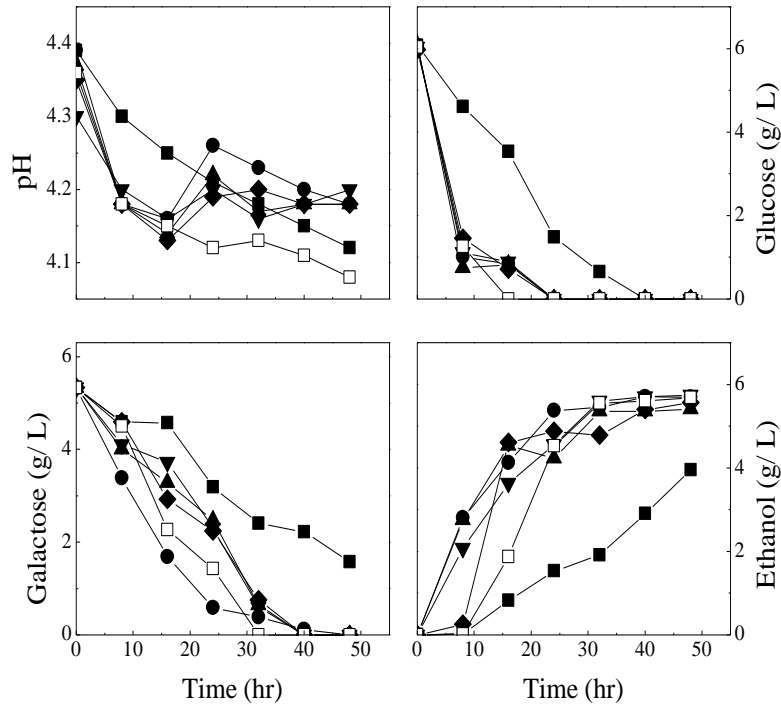


圖 6. 以固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌在反應器發酵龍鬚菜水解醱以生產生質酒精-顆粒添加量之影響

顆粒添加量 (%) : (■) 5; (●) 10; (▲) 20; (▼) 30; (◆) 40; (□) 50

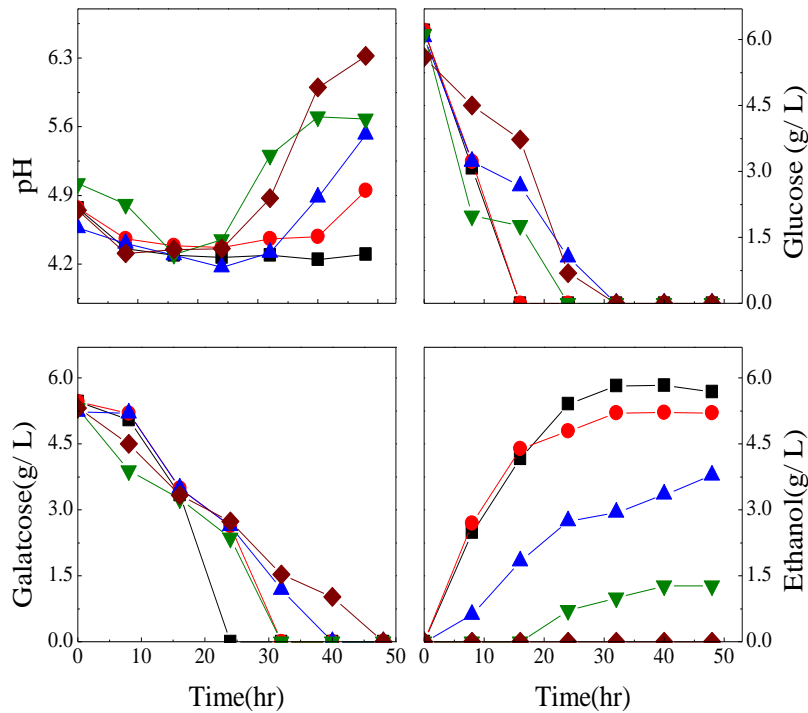


圖 7. 以固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌在反應器發酵龍鬚菜水解醱以生產生質酒精--曝氣量之影響

曝氣量 (L/min) : (■) 0; (●) 2; (▲) 5; (▼) 8; (◆) 10



### 3. 批次培養與連續饋料對固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌在反應器內生產生質酒精之影響

本實驗分為連續饋料培養與批次培養。首先加入 300 mL 生產培養基（龍鬚菜水解液 300 mL 及 yeast extract 2 g/L）後加入 10% 已固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 之顆粒，連續式培養在反應器的正上方與正下方接上蠕動幫浦以每分鐘 2.3 mL 的饋料速度進行 96 小時培養，而批次培養則於加入固定化菌顆粒後靜置培養直到 48 小時更換新的培養基，並分別定時取點分析 pH、醱類消耗與酒精生產。結果如圖 8 所示，連續饋料的酒精產量最高在 36 小時為 6.1 g/L，而批次培養的最高酒精產量在第一批次時是 48 小時 5.0 g/L，在第二批次時 96 小時 5.6 g/L，兩批次平均 5.3 g/L，在糖類消耗方面，連續饋料的醱類消耗較慢，其原因可能為流出的管線在反應器的正下方，導致部份懸浮在顆粒外的 *S. cerevisiae* Wu-Y2 直接流出反應器外，因而 Biomass 比批次培養的少，

故醱類的消耗比批次的慢。批次培養因為菌株不會流失且密閉性佳，較不易受到汙染，酒精的濃度較穩定，但在酒精量方面卻比連續饋料少許多，連續饋料雖然酒精的生產在 36 小時達到最高後產量就緩慢的降低，但在同一時間內（96 h）連續饋料可饋入 13.2 L（2.3 mL/min × 96 h × 60 min）培養液，較批次發酵（2 批次共發酵 600 mL）高，若計總酒精量，連續饋料各時期酒精濃度平均為 4.1 g/L，共饋入了 13.2 L，所得到酒精量為 54.1 g（13.2 L × 4.1 g/L），而批次發酵，2 批次共發酵 600 mL，所得到酒精量為 3.2 g（0.6 L × 5.3 g/L）。雖然批次培養酒精平均濃度（5.33 g/L）較連續饋料培養之酒精平均濃度（4.10 g/L）為高，但在同一反應器及相同發酵時間所能發酵之培養液量，連續饋料培養比批次培養高很多，因此相同發酵時間內連續饋料培養比批次培養所能生產之酒精總量高很多。

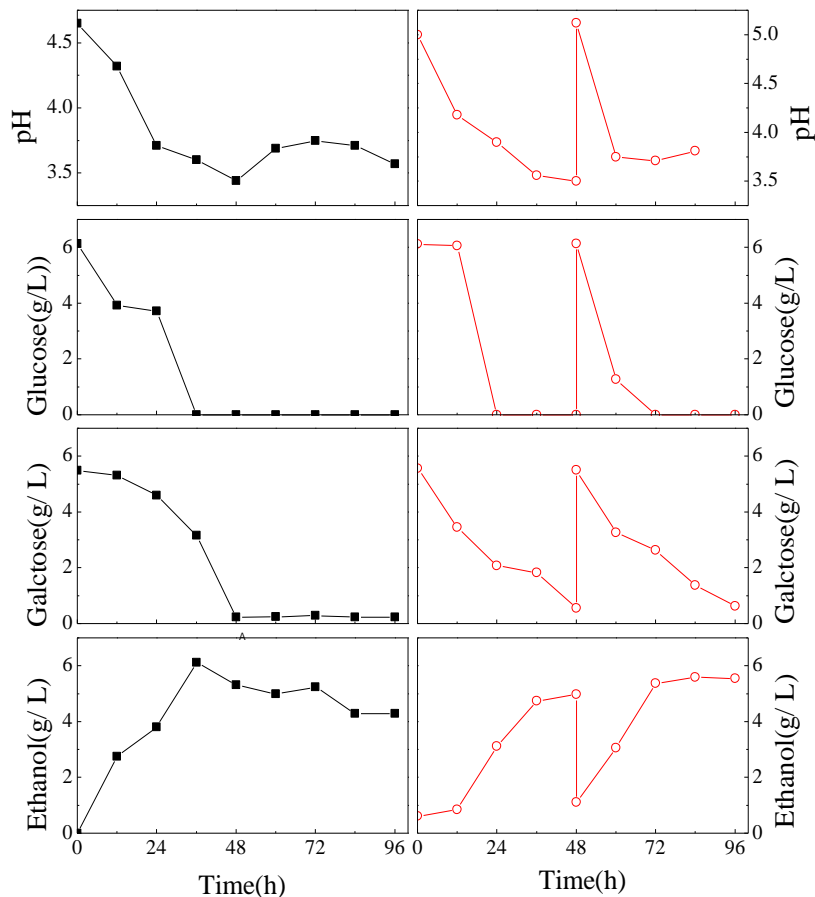


圖 8. 以固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌在反應器發酵龍鬚菜水解醱以生產生質酒精-批次培養與連續饋料培養  
培養方式：(■) 連續饋料；(○) 批次培養



#### 四、結論

本研究已證實 *S. cerevisiae* Wu-Y2 可有效的利用藻類水解單醣(葡萄糖與半乳糖)生產酒精，在懸浮培養與固定化系統培養中酒精最高產量分別為 4.6 g/L 與 4.9 g/L，最大轉化率分別為 88%與 94%。利用掃描式電子顯微鏡可有效的觀察發酵期間 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌株在固定化顆粒的表面與內部生長情形。在搖瓶批次培養中固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌可有效的利用龍鬚菜水解醣類(葡萄糖與半乳糖)生產生質酒精，且經五個批次的培養，菌株完全無弱化的現象。經過五批次培養之酒精平均產量為 5.0 g/L，而每批次之酒精生產皆接近於理想轉化率(98%)。以固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌於反應器中進行龍鬚菜水解醣類發酵生產酒精的探討，發現接種 10% 菌量，連續饋料及靜置培養(無曝氣)為最適生產條件。在連續饋料的實驗中以 2.3 mL/min 連續饋料 96 h，共饋料 13.2 L，酒精生產濃度平均為 4.1 g/L，可得到的酒精總量為 54.1 g。因此以固定化 *S. cerevisiae* Wu-Y2 菌發酵藻類水解液以生產酒精在生質能源之發展具有相當大的潛力。

#### 參考文獻

1. 黃新翔 (民 101)，利用固定化菌株顆粒以提升酒精產量之研究，大葉大學生物產業科技研究所碩士論文。
2. Adams, J. M., J. A. Gallagher and I. S. Donnison (2009) Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 569-574.
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. Luning, K. and S. Pang (2003) Mass cultivation of seaweeds: current aspects and approaches. *Journal of Applied Phycology*, 15(2), 115-119.
6. Miller, W. M., C. R. Wilke and H. W. Blanch (1987) Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. *Journal of Cellular Physiology*, 132 (3), 524-530.
7. Nigam, P. S. and A. Singh (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52-68.
8. 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.
9. Sánchez, Ó. J. and C. A. Cardona (2007) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(13), 5270-5295.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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：104.12.29 修正：105.03.04 接受：105.04.22

