

## 以酸水解龍鬚菜生產生質酒精

吳建威\* · 陳玉真 · 陳文君 · 吳純衡

行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

### 摘 要

本研究以龍鬚菜 (*Gracilaria*) 做為生質酒精之原料，探討最佳水解條件與利用發酵生產生質酒精之情形。結果顯示，以乾重 10.0% 固形物的龍鬚菜進行酸水解，水解條件為 0.5 N 的硫酸於 121 °C 下水解 60 min 可得最佳可發酵醣含量。水解液經 HPLC 分析顯示，大部份龍鬚菜水解產物為半乳糖 (galactose, 20 ~ 27 mg/mL) 及葡萄糖 (glucose, 2 ~ 5 mg/mL)；不過亦出現抑制酒精發酵的呋喃 (furan) 衍生物 5-hydroxymethyl furfuraldehyde (HMF) (4 ~ 6 mg/mL)，但無 furfural。以氫氧化鈉、氫氧化鈣及氧化鈣進行超鹼處理 (overliming)，結果顯示 HMF 均可減少 50% 以上。超鹼處理後之水解液以 38 株酵母進行酒精發酵，結果得到最佳發酵之菌株為 B4 (10.0 g/L) 與 B10 (8.3 g/L)。進一步試驗觀察發酵時間，結果在發酵第七天的酒精產率可達到最高 (8.7 g/L)。估算乾基龍鬚菜之酒精產率約為 13 ~ 16%。

關鍵詞：海藻、龍鬚菜、生質酒精、發酵

### 前 言

近來由於國際原油價格節節高升，使得人類不得不積極正視其他替代能源的開發問題，其中一項就是生質酒精 (Sarlos, 2005)。生質酒精主要目的是加入汽油中以達到減少汽油本身的使用量，因此在「節約原油」和「保護環境」兩議題中，最引人注目的是植物的主成分—纖維素作為生質酒精的原料 (Saha, 2003)。不過現今常用的原料卻是由甘蔗或是玉米等穀物所生產的生質酒精 (Lin and Tanaka, 2006)，這樣的需求反而驟增了玉米等穀價上揚，不但使生質酒精成本變高也連帶讓糧食本身價格上漲。如果能利用非陸生的原料，如海洋中的海藻作為生質酒精的生產，讓農業用土地能繼續生產糧食，那麼糧食與生質酒精彼此間「互相爭奪」的事情就可迎刃而解。

台灣四面環海，具有豐富海洋生物資源，藻類即其中一項。其中做為養殖九孔的餌料所需之

海藻則為龍鬚菜 (*Gracilaria*)，龍鬚菜屬於紅藻門 (Rhodophyta)、真紅藻綱 (Florideophyceae)、龍鬚菜目 (*Gracilariales*)、龍鬚菜科 (*Gracilariaceae*) 之龍鬚菜屬 (*Gracilaria*) (紀, 1997)。主要分布於臺灣、日本、印度、菲律賓、印尼、中國等地區 (Singh, 1992)。Lin (2009) 依分生序列分析顯示臺灣養殖種的龍鬚菜應為 *Gracilaria firma*，主要分布於中南部沿岸，每月可採收一次，年產量約達濕重 47 噸/公頃 (Fan *et al.*, 2009)。

侯 (2006) 曾利用纖維酶 (cellulase) 來水解龍鬚菜，使其產生葡萄糖作為生質酒精之發酵基質。不過，龍鬚菜主要成分是由洋菜醣 (agarose) 所構成的洋菜膠 (agar)，這是由  $\beta$ -D-右旋半乳糖 ( $\beta$ -D-galactose)、3,6-脫水左旋半乳糖 (3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galactose) 分別以  $\beta$ -1,4-鍵與  $\alpha$ -1,3-鍵連結所組成的同質多醣 (Araki, 1956; Tako *et al.*, 1999)。Araki (1956) 指出洋菜醣經由酸或酵素水解後可產生右旋半乳糖與 3,6-脫水左旋半乳糖，因此酵母可利用半乳糖轉換成酒精 (Wilkison, 1949)，使得龍鬚菜具有生產生質酒精之原料的潛力。故本研究依據 Fan *et al.* (2009) 的結果，進一步利用硫酸來進行龍鬚菜多醣的水解，探討最適水解條件，

\* 通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-2101; FAX: (02) 2463-2677; E-mail: cwwu@mail.tfrin.gov.tw

並將水解後所產之單醣作為酵母發酵之基質，讓生質酒精的研究領域增加新的材料和生產方式。

## 材料與方法

### 一、材料

#### (一) 龍鬚菜

龍鬚菜 (*Gracilaria*) 取自雲林縣口湖鄉龍鬚菜養殖場，龍鬚菜於採集後，經過自來水洗淨、去除附著泥沙，再以60 °C 烘乾至水分約為 30%，並於室溫下保存備用。

#### (二) 酵母菌種

篩選來自市售烘焙與釀酒用之酵母，單離後分別將其編號為B1~27。另外食品工業發展研究所購進之酵母有：*Saccharomyces (S.) cerevisiae* BCRC 20581、*S. cerevisiae* BCRC 21962、*S. cerevisiae* BCRC 21686、*S. cerevisiae* BCRC 21607、*S. cerevisiae* BCRC 22220、*S. bayanus* BCRC 21673、*S. cerevisiae* BCRC 21687、*Pachysolen (Pa.) tannophilus* BCRC 20329、*Candida (C.) shehatae* var. *shehatae* BCRC 22510、*Pichia (Pi.) holstii* BCRC 20469、*Pi. angophorae* BCRC 21481等共38株菌。以上酵母菌株皆以YM培養基 (Difco, USA) 進行25 °C 培養並保存於4 °C下，每週活化一次備用。

#### (三) 化學藥品

硫酸 ( $H_2SO_4$ ) 購自Panreac (Spain)；氫氧化鈣 ( $Ca(OH)_2$ ) 及氧化鈣 ( $CaO$ ) 等來自 Showa Chemical Inc. (Japan) 屬於試藥級。分析藥品如：乙醇 (ethanol) 購自Merck (Germany)；其餘之纖維素二醣 (cellubiose)、半乳糖、葡萄糖、半乳糖醇 (galactitol)、甘露糖醇 (mannitol)、葡萄糖醇 (sorbitol) 以及呋喃 (furan) 衍生物 5-hydroxymethyl furfuraldehyde (HMF) 和2-furaldehyde (fufural) 皆由 Sigma (USA) 所購得，皆屬於化學分析級。

### 二、方法

#### (一) 龍鬚菜酸水解條件探討

##### 1. 不同濃度之硫酸對水解程度之探討

未粉碎之乾燥龍鬚菜，或經粉碎機粉碎並通過35 mesh篩網之乾燥龍鬚菜，分別以15% 添加比例，加入100 mL 不同濃度之硫酸水溶液中 (0.05、0.10、0.50、及1.00 N)，裝入250 mL 血清瓶中，於殺菌釜以 121 °C 進行熱處理水解 60 min，待冷卻後再以0.5、1.0、或10 N 之 NaOH 中和調至 pH 6.0，分析水解液中葡萄糖與半乳糖之含量。

##### 2. 酸水解時間之建立

以 15% 添加比例將乾燥龍鬚菜加入 100 mL 濃度為 0.5 N 之硫酸水溶液中，裝入 250 mL 之血清瓶中，分別於殺菌釜以121 °C 進行熱水解 0、15、30、45、60、及 120 min，待冷卻後再以 0.5、1.0、或 10 N之 NaOH 進行中和至 pH 6.0，分析水解液中葡萄糖與半乳糖之含量。

##### 3. 不同固形物百分比之龍鬚菜之水解探討

比較不同固形物百分比之龍鬚菜 (5.0%、7.5%、10.0%、12.5%、及15.0%) 加入100 mL 濃度為0.5 N之硫酸水溶液中，裝入250 mL 之血清瓶中，分別於殺菌釜以 121 °C 進行熱水解 60 min，待冷卻後再以0.5、1.0、或 10 N 之 NaOH 進行中和至 pH 6.0，分別分析水解之醣類含量。另外將水解物分別再以 1,500、5,000、及15,000 × g 之離心力進行離心，測其懸浮液體積，換算葡萄糖與半乳糖之總和量。

##### 4. 龍鬚菜酸水解物之超鹼處理 (overliming)

經上述最佳條件探討後，採 10% 之乾燥龍鬚菜加入濃度為 0.5 N 之硫酸水溶液中，裝入血清瓶中，於殺菌釜以 121 °C 進行熱水解 60 min 後，參照並修飾 Saha *et al.* (2005) 方法，將所得水解液以氫氧化鈉、氫氧化鈣或氧化鈣等不同鹼，於80 °C 下調至 pH 11.0 反應 30 min，隨之再以硫酸調回 pH 6.0，分析抑制物質及葡萄糖與半乳糖含量變化情形。

#### (二) 龍鬚菜酸水解物之醣類與呋喃衍生物之分析

將海藻水解液以15,000 × g 之離心力進行離心，取上清液經0.2 μm 濾膜 (Gelman, USA) 過濾後，以HPLC (雙活塞輸送幫浦：LC-9A, Kyoto,

Japan; 折射率偵測器: Perkin Elmer® Series 200 refractive index detector, USA; 層析管柱: Shodex SUGAR SP-G [6.0 mm ID × 50 mm] + SP0810 [8.0 mm ID × 300 mm] Showa Denko, Japan) 進行分析。移動相為純水, 流速: 1.0 mL/min, 管柱溫度 80°C。樣品每次注射量為 10 µL。樣品測定前, 先以標準品: cellubiose、galactose、glucose、mannitol、sorbitol 等醣類以及 HMF 和 furfural 等呋喃衍生物完成標準曲線繪製, 之後比對樣品的滯留時間及波峰面積, 換算樣品中各單醣、醣醇及呋喃衍生物含量。

### (三) 龍鬚菜酸水解液作為生質酒精發酵之合適菌種篩選

#### 1. 以半乳糖作為酒精發酵培養液

配製 200 mL 之 YPG 培養基: 1% yeast extract (Difco, USA) + 2% peptone (Difco, USA) + 10% galactose (Sigma, USA), 裝入 250 mL 血清瓶中, 於殺菌釜滅菌後冷卻至室溫後, 分別接種 0.5% 之酵母菌, 於 25°C 培養箱中進行靜置發酵, 七天後測酒精含量。

#### 2. 以龍鬚菜酸水解及超鹼處理液作為酒精發酵培養液

以 10% 添加比例將乾燥龍鬚菜加入 200 mL 濃度為 0.5 N 之硫酸水溶液中, 裝入 250 mL 血清瓶中, 於殺菌釜以 121 °C 進行熱水解 60 min 後, 經氫氧化鈣超鹼處理後, 待冷卻至室溫, 分別按上述半乳糖發酵之條件, 接種酵母菌進行酒精發酵, 並於 7 天後測酒精含量, 以篩選合適龍鬚菜酸水解產物之酒精發酵菌株。

#### 3. 酒精發酵時間之影響

依上述條件, 利用所挑選合適酵母分別以單一菌或混合菌, 進行超鹼處理後龍鬚菜酸水解及過鹼處理後之產物的酒精發酵。分別於 0、3、5、7、9、及 14 天中進行酒精含量測定。

### (四) 酒精含量測定

將海藻發酵液依 AOAC (1998) 方法酒精蒸餾後, 經 0.2 µm 濾膜 (Gelman, USA) 過濾後, 利用 HPLC (雙活塞輸送幫浦: LC-9A, Kyoto, Japan;

偵測器: Shodex RI Showa Denko, Japan; 層析管柱: Shodex RSpak DE-G [4.6 mm ID × 10 mm] + DE-613 [6.0 mm ID × 150 mm] Showa Denko, Japan) 進行測定。移動相為純水, 流速: 1.0 mL/min, 管柱溫度 60 °C。樣品每次注射量為 20 µL, 分析前先以乙醇標準品完成標準曲線繪製, 之後比對樣品的滯留時間及波峰面積, 換算樣品中酒精之含量。

### (五) 統計分析

實驗數據以 Statistical Analysis System (SAS, 1999) 軟體進行 Duncan's 多重範圍檢定 (Duncan's multiple-range test), 分析各處理組間之差異, 除了可利用半乳糖與龍鬚菜酸水解物做為酒精發酵之合適酵母菌篩選為二重複外, 每組均三重複, 並求平均值, 顯著水準定為  $p < 0.05$ 。

## 結果與討論

### 一、龍鬚菜酸水解條件

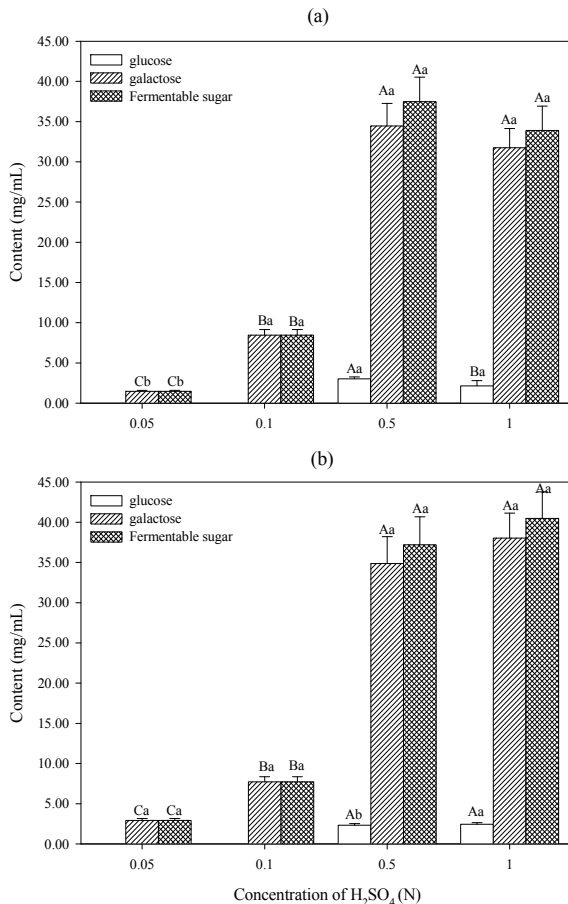
#### (一) 硫酸之濃度

以未經粉碎處理之固形物比 15% 的乾燥龍鬚菜, 在 0.05、0.10、0.50、及 1.00 N 硫酸濃度下進行酸水解, 以 HPLC 分析, 其葡萄糖產率分別為 0、0、3.02、及 2.14 mg/mL; 半乳糖產率則分別為 1.47、8.46、34.46、與 31.8 mg/mL, 由於此兩種糖可被酵母利用轉換為酒精故定義為可發酵醣, 其產率則分別為 1.47、8.46、37.47 與 33.89 mg/mL (Fig. 1a)。顯示以酸濃度為 0.5 N 可得較高之可發酵醣含量, 故本試驗以 0.5 N 硫酸為最適濃度。

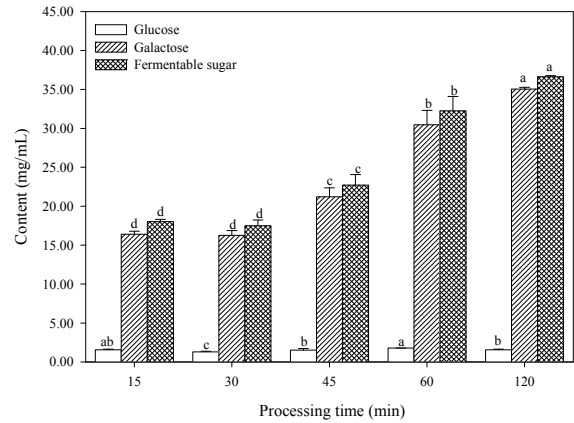
將乾燥龍鬚菜以粉碎機進行粉碎, 並通過 35 mesh 之篩網後, 再分別以 0.05、0.10、0.50、及 1.00 N 之硫酸進行水解, 以 HPLC 分析, 其葡萄糖產率分別為 0、0、2.32、及 2.45 mg/mL (Fig. 1b); 半乳糖產率則分別為 2.93、7.73、34.86、與 38.03 mg/mL; 可發酵醣產率則分別為 2.93、7.73、37.18、和 40.47 mg/mL。經由統計分析結果, 以 0.5 N 之硫酸進行水解雖然在葡萄糖產生量上以未粉碎部份較高, 統計上有顯著差異, 但是在半乳糖以及可發酵醣含量方面, 兩個處理過程間並無顯著差

異，因此推論粉碎步驟並不會增加龍鬚菜酸水解的產醣率。

殺菌釜條件下 (121°C)，加熱時間為 15、30、45、60、與 120 min，水解後，經 HPLC 分析，葡萄糖產率分別為 1.57、1.30、1.52、1.80、及 1.57 mg/mL；半乳糖產率則分別為 16.40、16.25、21.20、30.45、與 35.05 mg/mL；可發酵醣產率則為 18.02、17.49、22.72、及 36.62 mg/mL (Fig. 2)。結果顯示在 121°C 溫度下，可發酵醣產率有隨著處理時間的增加而增加之趨勢，但熱處理 120 min 所得之可發酵醣含量雖然較 60 min 組為高，且有統計上差異，但是增加一倍時間，醣含量並無倍數增加，因此基於成本考量，我們認為最佳水解時間可設為 60 min。



**Fig. 1** Effect of different concentrations of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on hydrolyzing *Gracilaria* for sugars production. (a) *Gracilaria* did not smash; (b) *Gracilaria* after ground and sieved through 35 mesh sieve. Capital letters in the same groups of columns and lowercase letters in the same groups of columns between (a) and (b) are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2** Effect of different processing times at 121°C autoclave on hydrolyzing *Gracilaria* for sugars production. Different letters over columns in the same groups indicate values are significantly different ( $P < 0.05$ ).

### (三) 龍鬚菜水解之不同固形物百分比探討

將龍鬚菜以 5.0%、7.5%、10.0%、12.5% 及 15.0% 的比例，加酸於 121 °C 水解 60 min 後水解產物的性狀如 Fig. 3，在 5.0 與 7.5% 的比例下為液狀水解物，10.0% 以上出現泥團狀水解物。水解所得可發酵醣含量依序為 11.99、16.93、23.93、26.76、與 32.57 mg/mL (Table 1)，顯示隨著固形物百分比的增加，所得可發酵醣含量亦會隨之增加。但是若進一步將水解產物分別以 1,500、5,000、及 15,000 × g 之離心力進行離心，測其懸浮液體積再換算可發酵醣之總量，發現需經由 15,000 × g 離心後各固形物百分比之間才有統計上差異，依序為 81.41、104.19、120.85、124.07、與 144.70 mg (Table 2)，15.0% 之固形物比所得之可發酵醣含量最高。然而 15.0% 組原料是 5.0% 組的 3 倍，可是換算產醣量比值只有 1.8 倍，而原料比值是 5.0% 組 2 倍的 10.0% 之固形物產醣量為 1.5 倍，比起其他固形物組而言，較為接近，故龍鬚菜最適水解比例為 10.0% 之固形物。

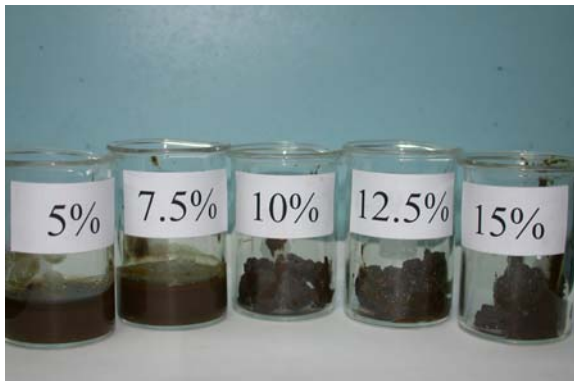
另一方面，雖然 15.0% 之固形物比所得之可發酵醣含量最高，但是超過 15.0% 固形物比的話，會因龍鬚菜容易吸水使部份藻體無法與酸溶液接觸，導致整體酸水解會不均勻，而無法進行酸水解過程。因此龍鬚菜酸水解可操作之固形物比最高無法超過 15.0%。

**Table 1** The sugar and HMF contents in the acid treated hydrolysates of different solid-content *Gracilaria*<sup>1</sup>

Solid content (%)	Glucose (mg/mL)	Galactose (mg/mL)	Fermentable sugar <sup>2</sup> (mg/mL)	HMF (mg/mL)
5.0	0.68±0.14 <sup>b3</sup>	11.31±0.39 <sup>c</sup>	11.99±0.25 <sup>c</sup>	1.60±0.01 <sup>c</sup>
7.5	1.02±0.52 <sup>b</sup>	15.92±1.01 <sup>c</sup>	16.93±1.52 <sup>c</sup>	2.76±0.34 <sup>bc</sup>
10.0	1.91±0.01 <sup>a</sup>	22.03±2.23 <sup>b</sup>	23.93±2.29 <sup>b</sup>	3.55±1.09 <sup>bc</sup>
12.5	2.32±0.01 <sup>a</sup>	24.43±2.03 <sup>b</sup>	26.75±2.02 <sup>b</sup>	4.84±1.25 <sup>b</sup>
15.0	2.56±0.18 <sup>a</sup>	30.02±3.46 <sup>a</sup>	32.57±3.63 <sup>a</sup>	7.21±0.76 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Mean ± standard deviation (from three replicates).<sup>2</sup>Fermentable sugar = Glucose + Galactose.<sup>3</sup>Values with different superscript alphabets in the same column differ significantly ( $P < 0.05$ ).**Table 2** The total fermentable sugar contents in the supernatants centrifuged with different speeds of different solid-content *Gracilaria* samples prepared hydrolysates<sup>†</sup>

Solid content (%)	Total fermentable sugars (mg)		
	1,500 × g	5,000 × g	15,000 × g
5.0	58.85±2.24 <sup>ab‡</sup>	68.26±1.78 <sup>b</sup>	81.41±0.65 <sup>d</sup>
7.5	73.12±1.50 <sup>a</sup>	86.91±2.01 <sup>a</sup>	104.19±2.98 <sup>c</sup>
10.0	56.22±2.04 <sup>ab</sup>	90.50±4.97 <sup>a</sup>	120.85±6.56 <sup>bc</sup>
12.5	51.48±7.58 <sup>b</sup>	87.94±8.66 <sup>a</sup>	124.07±6.37 <sup>b</sup>
15.0	54.30±19.35 <sup>b</sup>	99.90±19.54 <sup>a</sup>	144.70±19.85 <sup>a</sup>

<sup>†</sup>Mean ± standard deviation (from three replicates).<sup>‡</sup>Values with different superscript alphabets in the same column differ significantly ( $P < 0.05$ ).**Fig. 3** Acid hydrolyzed results of different solid-content *Gracilaria*.

#### (四) 龍鬚菜水解物之超鹼處理

由於上述分析結果顯示，龍鬚菜水解物會出現 HMF，可能會影響酵母菌的發酵能力。故本研究使用氫氧化鈉、氫氧化鈣及氧化鈣等不同鹼性化合物來進行水解物之超鹼處理，結果如 Table 3 所示，未經超鹼處理之控制組與使用各種鹼之超

鹼處理後的 HMF 含量分別為 5.01、2.29、2.25、及 1.79 mg/L，各處理過後之 HMF 含量皆比控制組顯著減少 50% 以上，但各鹼處理組之 HMF 減少量則無顯著差異出現。超鹼處理後半乳糖含量除了氫氧化鈉組外其餘會減少，推測是與鈣產生沈澱所致，此須進一步實驗方可加以證明。Olsson and Hahn-Hägerdal (1996) 提及抑制物的排除方式有很多種，包括添加活性碳、有機溶劑萃取、離子交換法 (ion-exchange)、離子排阻法 (ion exclusion)、分子篩法 (molecular sieves)、蒸汽排除法 (steam stripping) 及超鹼處理法等。但這些處理都會造成成本增加，除非不得已盡量避免使用，一般最常用的方式為過鹼法處理。

#### 二、龍鬚酸水解產物成分

根據 Araki (1956) 與 Tako *et al.* (1999) 的研究顯示，龍鬚菜多醣主要是由洋菜醣所構成的洋菜膠，這是由 β-右旋半乳糖、3,6-脫水左旋半乳

**Table 3** Effects of different alkali overliming treatments on the fermentable sugars and HMF productions from the *Gracilaria* acid hydrolysate<sup>†</sup>

Alkali	Glucose (mg/mL)	Galactose (mg/mL)	Fermentable sugar (mg/ml)	HMF (mg/mL)
Control	3.43±0.07 <sup>†*</sup>	23.31±0.86 <sup>a</sup>	26.68±0.96 <sup>a</sup>	5.01±1.06 <sup>a</sup>
NaOH	2.02±0.08 <sup>a</sup>	22.59±0.62 <sup>a</sup>	24.55±0.74 <sup>ab</sup>	2.29±0.39 <sup>b</sup>
CaO	3.21±1.11 <sup>a</sup>	20.13±1.03 <sup>b</sup>	23.34±2.14 <sup>b</sup>	2.25±0.47 <sup>b</sup>
Ca(OH) <sub>2</sub>	3.45±1.39 <sup>a</sup>	18.32±0.03 <sup>b</sup>	21.77±1.42 <sup>b</sup>	1.79±0.21 <sup>b</sup>

<sup>†</sup>Mean ± standard deviation (from three replicates).

<sup>\*</sup>Values with different superscript alphabets in the same column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

糖分別以  $\beta$ -1,4-鍵與 $\alpha$ -1,3-鍵鍵結所組成的同質多醣。Araki (1956) 指出洋菜醣經由酸或酵素水解後可產生右旋半乳糖與 3,6-脫水左旋半乳糖。龍鬚菜酸水解產物經過 HPLC 分析，結果如 Fig. 4 顯示，第 10 與 12 min 分別為葡萄糖以及半乳糖的波峰，且龍鬚菜水解產物亦在這兩個位置出現了明顯的波峰，然而由上述文獻得知洋菜醣的成分是 $\beta$ -右旋半乳糖與 3,6-脫水左旋半乳糖以 1:1 重複單元構成，而本研究只出現半乳糖的波峰，由於無市售之 3,6-脫水左旋半乳糖標準品可進行比較，故推測半乳糖與 3,6-脫水左旋半乳糖波峰有重疊之情形。Kazłowski *et al.* (2008) 利用 size-exclusion chromatography (SEC) 與 NH<sub>2</sub>-column chromatography 之蒸發光散射檢測器 (evaporative light-scattering detector, ELSD) 分析系統則可分出這兩種醣成分。根據潘 (2008) 研究顯示，龍鬚菜碳水化合物之  $\beta$ -agrane 與酸水解所產之簡單醣類中 3,6-脫水左旋半乳糖所佔比例為 36.1%，半乳糖則有 63.9%，而葡萄糖則僅有 1.5%。

另一方面，在 6 min 出現一個波峰，推測是未被酸水解的多醣。所以綜合上述結果，龍鬚菜酸水解產物大部份為酵母菌可利用的半乳糖，少數為葡萄糖，以及殘存些許的多醣，其他不可利用的推測還有  $\beta$ -右旋半乳糖與 3,6-脫水左旋半乳糖鍵結而成的雙醣。

酸水解也出現了抑制酒精發酵的呋喃衍生物 HMF，但無 furfural (Fig. 4)。若以木質纖維作為生質酒精原料，經由酸處理則會產生 furfural 與 HMF 等呋喃衍生物，其中 furfural 是因半纖維素 (hemicellulose) 被酸解成木醣 (xylose) 之五碳醣

進一步轉換成 furfural 所得而來的，而 HMF 是由半纖維素與纖維素 (cellulose) 被酸解成半乳糖、葡萄糖及甘露糖 (mannose) 等六碳醣，再進一步生成得來的 (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000)。龍鬚菜經酸處理會產生 HMF，但是沒有 furfural，顯示龍鬚菜並無五碳醣所構成之半纖維素，加上另外由水解物可測到葡萄糖，顯示龍鬚菜的細胞壁多醣體是屬於纖維素，這也是 Martin *et al.* (1988) 會利用纖維酶前處理來增加龍鬚菜的洋菜膠萃取率之原因。

### 三、龍鬚菜酸水解液作為生質酒精發酵之合適酵母菌菌種篩選

#### (一) 篩選可利用之半乳糖做為酒精發酵之酵母菌

以半乳糖做為酒精發酵培養液的篩選結果如 Table 4 所示，除了 B15 這株菌無法產生酒精外，其餘 37 菌株或多或少皆能利用半乳糖產生酒精。理論上來說一分子的葡萄糖或半乳糖可產生兩分子的乙醇，也就是說 100 g/L 葡萄糖或半乳糖可產生約 51 g/L 的乙醇 (Ingledew, 1999)，假設把產生 50 g/L 的酒精當作對半乳糖之酒精轉換率 100%，因此 Table 4 結果顯示超過 60% 以上都是 *S. cerevisiae*；*S. bayanus* BCRC 21673 的轉換率亦達到 60%；而可利用五碳醣之酵母菌 *C. shehatae* var. *shehatae* BCRC 22510、與 *Pa. tannophilus* BCRC 20329、*Pi. holstii* BCRC 20469、*Pi. angophorae* BCRC 21481，其中除了 *Pi. angophorae* BCRC

21481 均有達到 60% 外,其餘皆小於 50%。Keating *et al.* (2004) 篩選可快速利用半乳糖的酵母菌,發現一株野生株之 *S. cerevisiae* 對半乳糖利用情形相當良好。Maleszka *et al.* (1982) 則發現 *Pa. tannophilus* 除了可利用木糖外也能利用葡萄糖、半乳糖與甘露糖,與本研究所觀察到此菌可利用半乳糖的情形相似。Wilkinson (1949) 提到能利用半乳糖的酵母菌存有特定的酵素包括 galactose permease、galactosekinase、hexose-1-phosphate uridylyltransferase、和 UDP-glucose-4-epimerase 等,所以半乳糖轉換成酒精是一種耗能的代謝 (Keating *et al.*, 2004)。

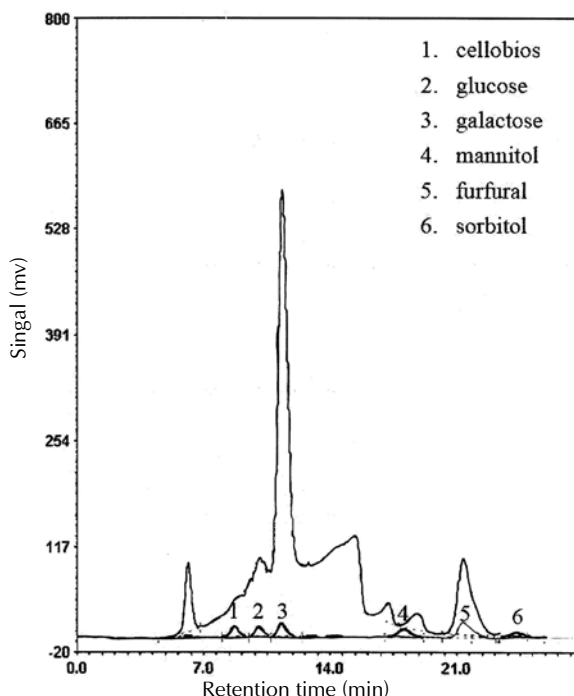


Fig. 4 HPLC analysis of *Gracilaria* acid hydrolysate.

## (二) 篩選可利用龍鬚菜酸水解物作為酒精發酵之酵母菌

由於 Nilsson *et al.* (2005) 提及不同酵母菌種對 furfural 或 HMF 的耐受性不同,為了尋求適合應用在龍鬚菜酸水解產物的酵母菌,因此以 38 株酵母菌加以篩選。結果發現原先可利用半乳糖的酵母菌僅剩下幾株來自市售烘焙與釀酒者可利用龍鬚菜酸水解產物,其中以 B4 表現最佳,可達 10.0 g/L 酒精產量,其次為 B10 之 8.3 g/L, B17、B18、與 B27 則為 8.0 g/L,而來自食工所之菌株

全部無法利用龍鬚菜酸水解產物發酵產生酒精 (Table 5)。除了 B4 與 B10 在半乳糖和龍鬚菜水解物的利用情形表現一致外,原本對半乳糖利用不佳的 B17 與 B18 對龍鬚菜水解物的利用反而變好,其詳細機制有待探討。這些對半乳糖和龍鬚菜水解物的利用表現不同的酵母菌,推測原因各酵母對這些龍鬚菜水解物存在的抑制物質之耐受性不同所致。本試驗結果顯示適合作為龍鬚菜酸水解液之酒精發酵酵母菌為 B4 與 B10。

## (三) 篩選可利用超鹼處理的龍鬚菜酸水解物做為酒精發酵之酵母菌

超鹼處理是否對龍鬚菜水解物之酒精發酵有改善,將各種鹼處理過之龍鬚菜水解液接種 0.5% 的混合酵母菌 B4、B6、B10、及 B27 (1:1:1:1) 進行酒精發酵,於 0、3、5、7、9、及 14 天測得酒精含量如 Fig. 5 所示。可觀察到未經超鹼處理之控制組,混合酵母菌需到第七天才有 0.18 g/L 的酒精含量,產量非常低。其次是以氧化鈣處理後,發酵所產之酒精含量亦於第七天 0.51 g/L 達到平穩。而氫氧化鈉處理組於第七天也達到平穩,但酒精產量提升為 3.35 g/L。以氫氧化鈣處理組在第三天的酒精產量可到 3.30 g/L,到第九天時則增加至 5.01 g/L,為三組中酒精產量最高之鹼處理組。因此氫氧化鈣之超鹼處理方式對龍鬚菜酸水解發酵之應用較佳。然各鹼之間所造成酒精發酵產率之差異性,則需進一步實驗探討,方可確定其機制。

## (四) 龍鬚菜酸水解液之酒精發酵時間分析

利用上述所挑選合適酵母菌 B4 與 B10,分別以單一菌或混合菌,進行龍鬚菜水解物之酒精發酵。分別於 0、3、5、7、9、及 14 天中進行酒精測定,結果如 Fig. 6 所示, B4 與 B10 單一菌及二菌混合培養方式在發酵第三天所得到之酒精含量分別為 4.99、4.70、及 5.30 g/L,第 7 天則分別為 7.50、6.97、與 8.70 g/L,酒精發酵達到平穩,顯示混合培養方式產量較高,但並無統計差異。此結果比接種了 B4、B6、B10、及 B27 等混合酵母菌發酵所得酒精含量較高 (Fig. 5),推測因 B6 這株菌無法由龍鬚菜水解物中生產出酒精 (Table 5),又繼續利用發酵中的醴類維持生理所需,導致可發酵醴含量減少而造成酒精生成量偏低的主因。

**Table 4** Ethanol production of YPG fermented with 38 yeast strains<sup>†</sup>

Starter	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Ethanol content (g/L)	40.0	35.0	40.0	40.0	37.5	37.5	35.0	40.0	32.0	39.0
Starter	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20
Ethanol content (g/L)	41.1	5.0	1.5	0.3	0.0	1.7	0.6	1.9	7.8	4.6
Starter	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	20581	21962	21686
Ethanol content (g/L)	33.0	30.0	22.0	31.0	30.0	33.0	33.0	31.0	32.0	35.0
Starter	21607	22220	21673	21687	20329	22510	20469	21481		
Ethanol content (g/L)	30.0	31.0	30.0	38.0	14.0	25.0	16.0	30.0		

<sup>†</sup>B1-B27: commercial baker of wine production yeast; 20581: *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 20581; 21962: *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21962; 21686: *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21686; 21607: *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21607; 22220: *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 22220; 21673: *Saccharomyces bayanus* BCRC 21673; 21687: *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21687; 20329: *Pachysolen tannophilus* BCRC 20329; 22510: *Candida shehatae* var. *shehatae* BCRC 22510; 20469: *Pichia holstii* BCRC 20469; 21481: *Pichia angophorae* BCRC 21481.

<sup>‡</sup>Data were obtained from two independence experimental samples, and the values were means.

**Table 5** Ethanol production of *Gracilaria* acid hydrolysates fermented with 38 yeast strains

Starter	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Ethanol content (g/L)	1.0	1.3	3.0	10.0	0	0	4.0	0	0	8.3
Starter	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20
Ethanol content (g/L)	0	0	0	0	0	0	8.0	8.0	7.8	7.3
Starter	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	20581	21962	21686
Ethanol content (g/L)	2.3	0	0	0	0	1.0	8.0	0	0	0
Starter	21607	22220	21673	21687	20329	22510	20469	21481		
Ethanol content (g/L)	0	0	0	0	0	0	0	0		

<sup>†</sup>B1-B27: commercial baker of wine production yeast; 20581: *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 20581; 21962: *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21962; 21686: *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21686; 21607: *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21607; 22220: *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 22220; 21673: *Saccharomyces bayanus* BCRC 21673; 21687: *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21687; 20329: *Pachysolen tannophilus* BCRC 20329; 22510: *Candida shehatae* var. *shehatae* BCRC 22510; 20469: *Pichia holstii* BCRC 20469; 21481: *Pichia angophorae* BCRC 21481.

<sup>‡</sup>Data were obtained from two independence experimental samples, and the values were means.

由 Table 4 可看到無論 B4 或 B10 這兩株菌對半乳糖的利用率可達到將近 80%。Fig. 5 的可發酵醣含量為 25.60 g/L，以上述 Ingledew (1999) 的理論來看，乙醇含量之理論值為 13.06 g/L ( $25.6/0.51 = 13.06$ )，但是考量 B4 或 B10 對半乳糖利用率 80%，故 13.06 g/L 乘上 80% 得到 10.45 g/L，換算每克可發酵醣基質之乙醇產量則為  $10.45/25.60 = 0.41$  g ethanol/g substrate，該單位即表示龍鬚菜酸

水解液所產生的每 g 可發酵醣轉換成酒精的能力。B4 & B10 組第七天的酒精產量為 8.70 g/L (Fig. 5)，除上 25.60 為 0.34 g ethanol/g substrate，結果顯示已相當接近理論值 (0.41 g ethanol/g substrate)。再比較 Horn *et al.* (2000a, b) 的研究，他們以菌株 *Pi. angophorae* 及 *Zymobacter (Z.) plame* T109 進行昆布 (*Laminaria*) 萃取液發酵產酒精能力表現，結果 *Pi. angophorae* 可將昆布中的



成分昆布多醣 (laminaran) 及甘露糖醇轉化為生質酒精, 每克基質可生產 0.43 g 的乙醇, 而 *Z. plame* T109 會利用甘露糖醇轉換成乙醇, 能力表現上為 0.38 g ethanol/g 甘露糖醇。以龍鬚菜水解物進行發酵, 較海帶者所得酒精產率較低, 推測原因是海帶萃取物中沒有出現 furfural 或 HMF 的抑制物, 但是本實驗中卻有 HMF 存在, 因此可能降低了酵母的酒精發酵產率。

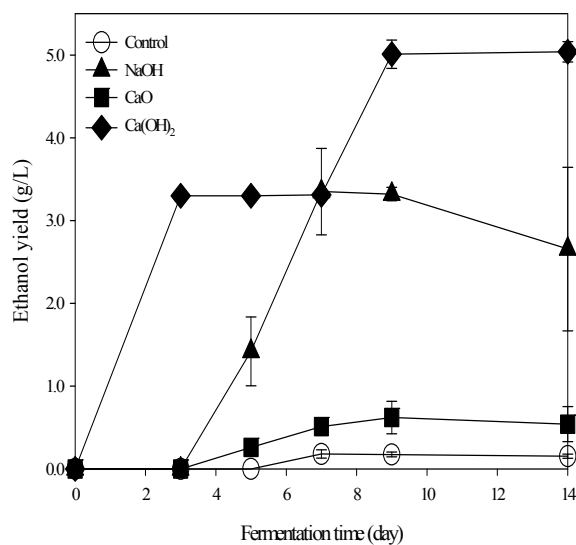


Fig. 5 Ethanol yields of different alkali overliming treatments of *Gracilaria* hydrolysates fermented with mixed yeast strains B4, B6, B10, and B27 (1:1:1:1).

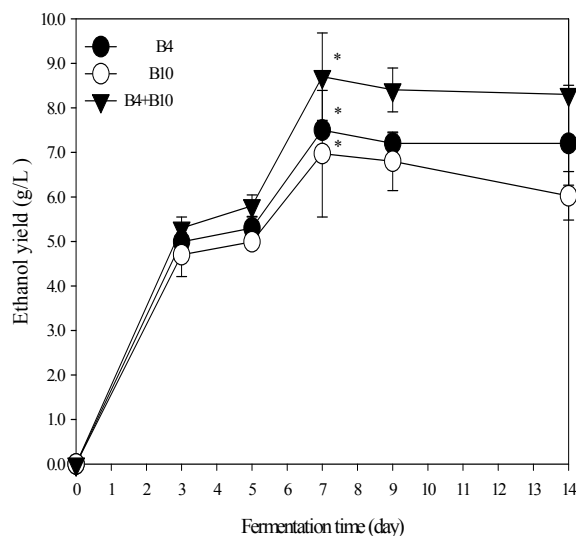


Fig. 6 Ethanol yields of the *Gracilaria* hydrolysates fermented with yeast strains B4, B10, and a mixture of B4 and B10 (1:1). \* indicates values are significantly different at the same fermentation time in the same groups ( $P < 0.05$ ).

## (五) 龍鬚菜酒精產率分析

本研究顯示, 每100 g/L乾基的龍鬚菜酸水解產物經發酵可產生8~10 g/L的酒精, 龍鬚菜中碳水化合物所佔比例為64%, 估算乾基龍鬚菜之酒精產率約為13~16% (8/64~10/64%)。比較日本獨立行政法人水產綜合研究中心 (2008) 的研究情報指出, 其利用石蓴及布袋蓮進行生質酒精研究, 分別可得酒精產率為各物乾基重之10% 與16%, 二者酒精產率近似。雖然上述研究可看到海藻確實可生產生質酒精, 但是以現行的發酵方式所得的酒精含量卻相當少, 跟日本所產的清酒15~20% (v/v) 相較之下, 日本進行的海藻發酵酒精研究只有0.5~1% (v/v), 顯見的是相當低。同樣地, 龍鬚菜的生質酒精產量以8 g/L 除上酒精密度0.78 g/L也只達1% (v/v)。這類原因在於海藻的醣類組成以酸性多醣為主, 如褐藻酸 (alginate) 和褐藻醣膠 (fucoidan) 等, 無法被陸上的酒精酵母所利用, 因此酒精產率偏低。這樣的問題很現實的反應出, 以海藻生產生質酒精之成本還是相當高, 目前暫時無法和陸生的生質酒精相比擬, 所以海藻生質酒精仍存有一大門檻需要突破。面對相同的困境, 日本的目標就是尋找可良好利用海藻寡醣類來生產酒精的海洋微生物, 這也是我們需要進行的共同目標。

## 參考文獻

- 日本獨立行政法人水產綜合研究センター (2008) 海藻類等からのバイオエタノールの生産収量を初めて確認. <http://www.fra.affrc.go.jp/pressrelease/pr19/200325-3/>.
- 侯詠德 (2006) 龍鬚菜之降解. 國立臺灣大學生物產業機電工程學研究所碩士論文, 台北, 30-45.
- 紀明侯 (1997) 海藻化學. 中國科學出版, 北京, 100-275.
- 潘崇良 (2008) 藻類生質能源之開發與未來應用. 海洋藻類資源與產業發展研討會, 基隆, 59-93.
- A.O.A.C. (1998) AOAC official method 920.57 Alcohol in wine. In Wines. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA.
- Araki, C. (1956) Structure of the agarose constituent of agar-agar. Bull. Chem. Soc. Jpn., 29: 543-544.
- Fan, C. C., Y. L. Lee, Y. W. Lu and C. H. Wu (2009) Algal polysaccharides extraction and algal residues. J. Taiwan Fish. Res., 17: 81-91.

- Horn, S. J., I. M. Aasen and K. Østgaard (2000a) Ethanol production from seaweed extract. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 25: 249-254.
- Horn, S. J., I. M. Aasen and K. Østgaard (2000b) Production of ethanol from mannitol by *Zymobacter palmae*. *J. Ind. Microbiol. and Biotech.*, 24: 51-57.
- Ingledeu, W. M. (1999) Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: A yeast primer. In *The Alcohol Textbook* (K. Jacques, T. P. Lyons and D. R. Kelsall eds.), Nottingham University Press, Nottingham, UK., 49-87.
- Kazłowski, B., C. L. Pan and Y. T. Ko (2008) Separation and quantification of neoagaro- and agaro-oligosaccharide products generated from agarose digestion by  $\beta$ -agarase and HCl in liquid chromatography systems. *Carbohydr. Res.*, 343: 2443-2450.
- Keating, J. D., J. Robinson, R. J. Bothast, J. N. Saddler and S. D. Mansfield (2004) Characterization of a unique ethanologenic yeast capable of fermenting galactose. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 35: 242-253.
- Lin, S.-M. (2009) Marine Benthic Macroalgal Flora of Taiwan. Part I order Gracilariales (Rhodophyta). National Taiwan Ocean University Press, Keelung, Taiwan, 50 pp.
- Lin, Y. and S. Tanaka (2006) Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69: 627-642.
- Maleszka, R., P. Y. Wang and H. Schneider (1982) Ethanol production from D-galactose and glycerol by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 4: 349-352.
- Martin, R. S., J. M. Aguilera and A. I. Hohlberg (1988) Effect of cellulase pretreatments on red algae agar extractability. *Carbohydr. Polym.*, 8: 33-43.
- Nilsson, A., M. F. Gorwa-Grauslund, B. Hahn-Hägerdal and G. Lidén (2005) Cofactor dependence in furan reduction by *Saccharomyces cerevisiae* in fermentation of acid-hydrolyzed lignocellulose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 7866-7871.
- Olsson, L. and B. Hahn-Hägerdal (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enz. Microb. Technol.*, 18: 312-331.
- Palmqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.*, 74: 25-33.
- Saha, B. C., L. B. Iten, M. A. Cotta and Y. V. Wu (2005) Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Proc. Biochem.*, 40: 3693-3700.
- Saha, B.C. (2003) Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 279-291.
- Sarlos, G. (2005) APECATC-2005 Workshop on Biomass.
- SAS (1999) SAS User's Guide: Basic Statistical Analysis. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.
- Singh, T (1992) Agar and Agar Production. INFOFISH Technical Handbook No. 7. INFOFISH, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Tako, M., M. Higa, K. Medoruma and Y. Nakasone (1999) A highly methylated agar from red seaweed, *Gracilaria arcuata*. *Botanica Marina*, 42: 513-517.
- Wilkinson, J. F. (1949) The pathway of the adaptive fermentation of galactose by yeast. *Biochem. J.*, 44: 460-467.

## Bio Ethanol from Acid-hydrolyzed *Gracilaria*

Chien-Wei Wu\*, Yu-Chen Chen, Wen-Chun Chen and Chwen-Herng Wu

Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

### ABSTRACT

*Gracilaria* sp., a red alga, was used as the material to produce bio ethanol. The hydrolytic processes for sugar conversion and yeast fermentation conditions were tested. The process of the highest amount of fermentable sugars obtained was that 10.0% *Gracilaria* (w/w, dry base) was prepared in a 0.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution and then autoclaved for 60 min at 121°C. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed that most hydrolysate were galactose 20-27 mg/mL, glucose 2-5 mg/mL, and 5-hydroxymethyl furaldehyde (HMF, an ethanol fermentation inhibitor) 4-6 mg/mL, and there was no fufural (also an ethanol fermentation inhibitor) found in the HPLC profile. The hydrolysate was further treated with overliming by adding sodium hydroxide, calcium hydroxide, or calcium oxide. Results showed that the HMF in the hydrolysate reduced to less than 50% with each of the treatments. The overlimed hydrolysate was then prepared as media for the test of 38 different yeast strains to produce ethanol. It was found that the competent strains were B4 and B10, which could produce about 10 and 8 g ethanol per liter, respectively. Further observation of the fermentation time, a highest yield of ethanol (8.7 g/L) was achieved in a batch culture at the 7th day. The ethanol producing ratio of *Gracilaria* hydrolysate was around 13-16%, while converted and calculated based on the dry base (w/w).

**Key words:** bioethanol, fermentation, *Gracilaria*, seaweed

---

\*Correspondence: 199, Hou-lh Rd., Keelung 202, Taiwan, TEL: (02) 2462-2101; Fax: (02) 2462-3306; E-mail: cwwu@mail.tfrin.gov.tw