

龍鬚菜之洋菜膠萃取與藻渣糖化處理

范繼中 李雅琳 盧雅雯 吳純衡*

行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

摘要

龍鬚菜 (*Gracilaria* sp.) 是台灣養殖產量最高的藻類，其碳水化合物含量 76.27% (乾基，粗纖維佔其中的 8.41%)，經萃取海藻多醣後的藻渣，可以進行糖化反應轉化成糖液，作為生質酒精發酵原料之用。本研究以反應曲面法分析，獲得海藻多醣最適萃取條件：先以 0.02 N 硫酸溶液浸泡乾燥龍鬚菜 0.3 hr 後，再以 100°C 沸水萃取海藻多醣 0.3 hr；以龍鬚菜海藻多醣含量為基準，計算其萃取率可達 64.8%。以苯酚-硫酸法分析萃出液的總醣量比較，此萃取法可高於直接沸水萃取法的 3 倍以上。剩餘藻渣仍含有高量碳水化合物 (乾基，60.93%，其中粗纖維佔 23.91%)，藻渣分別以酸水解、纖維素酶水解、以及先纖維素酶後酸水解處理，試驗其糖化效果，結果顯示經 1% 纖維素酶處理的藻渣水解液，再以 0.9 N 硫酸處理，於 121 °C 於殺菌釜中加熱 1 hr 的糖化產率最高；glucose 以藻渣粗纖維量、galactose 以藻渣海藻多醣量為計算基準，所得水解產率分別為 95.0% 與 43.5%。

關鍵詞：龍鬚菜、海藻多醣、纖維素酶、藻渣、糖化反應

前言

龍鬚菜 (*Gracilaria* sp.) 是台灣產量最大、利用率最高的海藻，主要養殖於嘉南沿海一帶，每個月皆可採收，其一年的生物量可以達到濕重 47 ton/ha (侯, 2006)。龍鬚菜約含有 70% 的碳水化合物，主要成分為洋菜 (agar, 日文為「寒天」)，是一種海藻多醣 (algal polysaccharides) (Marinho-Soriano and Bourret, 2005)，由 β -D-galactose 3,6-anhydro- α -L-galactose 兩種單醣分別以 β -1,4-bond 與 α -1,3-bond 連結組成的同質多醣 (Araki, 1956; Usov, 1998; Tako *et al.*, 1999)，由龍鬚菜萃取的海藻多醣，可經過加工製成食品添加物、保健食品以及生物培養基 (medium) 等高價值的產品，殘餘藻渣仍含有高量碳水化合物，以及非水溶性的蛋白質，然而，一般的利用方式是添加於土壤中製成培植土，是屬於低價值的加工附產品，殊為可惜。

利用生質作物轉化酒精代替化石燃料，是目前全球為因應石油耗竭所訂定的研發方向與能源政策 (Jorg and Sascha, 2008)。目前工業上最廣泛生產生質酒精的製程，是由碳水化合物轉化成可發酵糖，再以酵母菌發酵生產酒精 (翁, 2007)，主要原料是甘蔗汁或是玉米澱粉 (其水解糖液) (Saha *et al.*, 2005)，就長期發展看來，種植甘蔗、玉米等農業作物轉換能源，需要龐大的栽種面積，因而限制了其他糧食作物的生產，所以並非生質能源最適的原料 (Campo *et al.*, 2006; Dien *et al.*, 2006)。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% (Aresta *et al.*, 2005)，在海中立體生長，不會與糧食作物競爭陸地資源，所以被認為是最具有發展潛力的生質能源原料 (Horn *et al.*, 2000)。

海藻和陸地作物相較，除了高產量、不佔用陸地面積之外，海中浮力抵消重力因素，海藻纖維素分子 (大約以 160 個 glucose 鏈結) 小於陸生植物的纖維素分子 (約 360~1000 個 glucose 鏈結)，使得海藻結構較陸生植物鬆散 (紀, 1997)，因此，酒精製程中的糖化步驟較易進行，成本較低。本研究設計先萃取龍鬚菜中高經濟價值的海藻多

* 通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-3792; FAX: (02) 2463-2677; E-mail: chwu@mail.tfrin.gov.tw

醣，殘餘藻渣則用於酒精發酵的原料，其海藻多醣如果進行酸熱分解的糖化反應，會產生 glucose 與 galactose，一般酵母菌會先利用其中的 glucose，當 glucose 消耗殆盡後，才開始利用 galactose，以致完成發酵所需時間較長 (Jeffrey *et al.*, 2004)，時間成本較高；glucose 及 galactose 在相同時間下進行酒精發酵，glucose 之酒精產率為 galactose 的 3.3 倍 (Wilkison, 1949)。本研究先將部分海藻多醣移除，殘餘藻渣的纖維素比例因此提高，糖化後的糖液所含 glucose 濃度較高，預期可以獲得較高的酒精生產效率；此設計使龍鬚菜的海藻多醣與藻渣，充分獲得利用，並對高需求量的生質酒精，提供一種新的原料與生產方法。

材料與方法

一、材料

(一) 龍鬚菜

龍鬚菜取自雲林縣口湖鄉龍鬚菜養殖場，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) 纖維素酶

使用 Novozyme 公司 (Novozyme, Denmark) 之纖維分解酵素 (*Trichoderma reesei* celluclast 1.5 L, 750 units/mL)，內含 exo-1.4-β-D-glucose 分解酵素、endo-1.4-β-D-glucose 分解酵素，以及纖維二糖水解酵素，其最適反應條件為 pH 4.5、50 °C。

(三) 化學藥品

葡萄糖 (D-glucose)、半乳糖 (D-galactose)、硫酸 (sulfuric acid)、酚 (phenol) 購自德國默克化學製藥股份有限公司 (Merck, Darmstadt, Germany)。

二、方法

(一) 一般成分分析

依據 A.O.A.C. (1995) 制定方法測定。水分分析，將樣品置於 105 °C 烘箱乾燥至恆重；粗蛋白使用 micro-Kjeldahl 法分析；粗脂肪是將樣品乾燥後，於 Soxhlet 萃取器以乙醚迴流萃取；灰分以 550 °C 加熱灰化；碳水化合物為乾基試樣

100% 減去粗蛋白、粗灰分及粗脂肪之重量百分比。粗纖維測定方法，是取 1.0 g 乾燥龍鬚菜加入 100 mL 1.25% 硫酸煮沸 30 mins，濾去酸液並以熱蒸餾水清洗，加入 100 mL 1.25% NaOH 溶液，煮沸 30 mins 後，濾去鹼液並以熱蒸餾水清洗，於 105 °C 烘乾 4 hrs 秤重，再以 550 °C 灰化 2 hrs 後秤重，兩次重量差即為粗纖維含量。

(二) 海藻多醣含量及其萃取率之計算

龍鬚菜的碳水化合物，主成分為水可溶之海藻多醣及水不可溶之纖維素 (紀, 1997)，而龍鬚菜經由熱水處理可將其海藻多醣溶出，纖維素仍殘留於藻渣中 (Marinho-Soriano and Bourret, 2005)，因此，本研究中龍鬚菜海藻多醣的含量是將試樣中碳水化合物含量減去粗纖維含量所得之比例。海藻多醣的萃取率，是以萃取多醣後的乾燥藻渣，其多醣減少重量除以原乾燥龍鬚菜的多醣重量乘以百分率計算。

(三) 龍鬚菜海藻多醣萃取及其藻渣製備

1、最適海藻多醣萃取條件

利用反應曲面法 RSM (Response Surface Methodology) (Myers and Montgomery, 2002) 探討龍鬚菜海藻多醣最適萃取條件 (Table 1)。以三變數統計分析方法進行，控制變因為浸泡酸的濃度、浸泡時間，以及後續沸水萃取時間，分析萃取液之總醣量做為評估指標。以預試驗結果設定各控制變因之操作範圍，依據三變數之係數設定，按比例換算獲得實驗操作條件，實驗數據以統計迴歸方法計算反應曲面方程式係數，再以套裝軟體 EXECL 繪製反應曲面，並分析其最適多醣萃取條件。

2、海藻多醣萃取及藻渣製備流程

以反應曲面法設計之酸濃度、浸泡時間及萃取時間進行海藻多醣萃取試驗。每次取 10 g 乾燥龍鬚菜經過酸浸泡處理後，以乾淨自來水浸泡攪拌去除酸液，加入 25 倍於乾燥龍鬚菜重量的自來水，攪拌均勻後加熱，至水沸騰起開始計時，試驗不同的萃取時間條件。海藻多醣與藻渣的分離方式，是以 100 mesh 篩網過濾，並以擠壓方式將液體瀝出。此外，亦試驗直接沸水處理法，同

Table 1 Independent variable values of algal polysaccharides extraction and their corresponding levels

No.	Independent variables				Coded levels ¹									
	Acid concentration (N)	Immersion time (hr)	Extraction time (hr)	Total sugar (mg/mL)	X1 ²	X2 ³	X3 ⁴	X1*X2	X1*X3	X2*X3	X1 ²	X2 ²	X3 ²	
1	0.02	1.0	1.0	5.4	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	
2	0.08	1.0	1.0	5.2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	
3	0.02	3.0	1.0	4.6	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	
4	0.08	3.0	1.0	3.8	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	
5	0.02	1.0	3.0	5.7	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	
6	0.08	1.0	3.0	5.1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	
7	0.02	3.0	3.0	4.0	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	
8	0.08	3.0	3.0	3.3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
9	0.01	2.0	2.0	2.5	-1.682	0	0	0	0	0	2.829	0	0	
10	0.1	2.0	2.0	2.8	1.682	0	0	0	0	0	2.829	0	0	
11	0.05	0.3	2.0	6.1	0	-1.682	0	0	0	0	0	2.829	0	
12	0.05	3.7	2.0	4.3	0	1.682	0	0	0	0	0	2.829	0	
13	0.05	2.0	0.3	4.9	0	0	-1.682	0	0	0	0	0	2.829	
14	0.05	2.0	3.7	5.3	0	0	1.682	0	0	0	0	0	2.829	
15	0.05	2.0	2.0	5.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
16	0.05	2.0	2.0	5.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17	0.05	2.0	2.0	5.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
18	0.05	2.0	2.0	5.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
19	0.05	2.0	2.0	5.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
20	0.05	2.0	2.0	4.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

¹Three-level factorial design was used (Myers and Montgomery, 2002)

²The variable is a factor of acid concentration

³The variable is a factor of immersion time

⁴The variable is a factor of extraction time

樣加入 25 倍於乾燥龍鬚菜的自來水，加熱煮沸起計時萃取 1 hr，之後分離液體與藻渣。藻渣以 60 °C 於 8 hrs 烘乾後磨碎製成粉狀，放置於室溫保存，提供一般成分分析及後續水解試驗之用。

(四) 總醣分析

使用苯酚-硫酸法 (Dubois *et al.*, 1956) 分析總醣含量。取海藻多醣萃取液 1 mL，離心 2 mins 後，取 0.4 mL 上清液與 0.4 mL 5% phenol 水溶液均勻混合，加入 2 mL 濃硫酸 (36 N)，靜置 10 mins 後呈色，再以振盪器 (Barnstead, USA) 混合均勻，之後靜置 30 mins 使之反應完全。將呈色樣品稀釋後，再以分光光度計測量波長 490 nm 的吸光值。此法可以偵測中性醣類，由於龍鬚菜

的海藻多醣有部分醣基帶有硫酸根 (紀, 1997)，因此，分析所得之總醣量不包含酸性醣，此數據主要用於萃取條件優劣之探討。

(五) 藻渣水解處理

藻渣以酸、纖維素酶以及纖維素酶後酸水解等，三種方法處理，水解液以高效能液相層析儀 (High performance liquid column, HPLC) 分析其 glucose 及 galactose 的水解產率，以做為之後生質酒精生產原料、發酵培養液配方之依據。

1、酸水解

將藻渣置於樣品瓶中，加入不同硫酸溶液，以藻渣之乾基重量配製成 15% 固形物之 0.3、

Table 2 Proximate composition¹ of *Gracilaria* (% dry wt.) and the deduced algal polysaccharide contents

Sample	Crude protein	Crude fat	Crude ash	Crude fiber	Carbohydrate ⁴	Deduced algal polysaccharide ⁵
Dried algae	18.00±0.33	0.52±0.03	5.21±0.60	8.41±0.11	76.27	67.86 (5.96) ⁶
Algal residue ²	18.89±0.21	1.79±0.02	6.36±0.30	15.97±0.16	73.02	57.05 (3.24)
Algal residue ³	29.15±0.38	3.50±0.02	6.41±0.29	23.91±0.27	60.93	37.02 (2.10)

¹Data were calculated from three analyzed independent samples. Values are means ± SD (n = 3)

²The algal residues were derived from the extraction condition at 100°C for 1 hr

³The algal residues were derived from the extraction condition of 0.02 N-sulfuric acid immersion for 18 min and then heating at 100°C for 1 hr

⁴Carbohydrate was obtained by algae dry weight (100%) subtracted with crude protein (%), crude ash (%) and crude fat (%)

⁵Data were calculated by carbohydrate (%) subtracted with crude fiber (%)

⁶Data were the weight (g) of deduced algal polysaccharide

0.9、1.8、3.6 N 濃度酸液，以殺菌釜 121 °C、壓力 1.5 kg/cm²，加熱水解 1 hr；冷卻後以氫氧化鈉溶液中中和至 pH 6.0。

2、纖維素酶水解

藻渣加入去離子水與 acetate buffer (終濃度 0.02 M, pH 4.5)，配製成固形物 15% 之藻渣溶液，加入 1% 纖維素酶 (酵素/基質, v/w)，於 50°C 下、恆溫水浴槽中進行 48 hrs 酵素水解反應。

3、纖維素酶及酸水解

藻渣經過 1% 纖維素酶水解後，加入濃硫酸配製成 0.9 N 濃度的酸溶液，再以前述相同的酸水解條件進行反應。

(六) 單醣分析

水解液取上清液經 0.2 μm 濾膜過濾後，以 HPLC 進行單醣分析，其中包含雙柱塞輸送幫浦 (LC-9A, Kyoto, Japan)、折射率偵測器 (Perkin Elmer® Series 200 refractive index detector, USA)、鉛離子層析管柱 (SP0810, 8.0 mm ID × 300 mm, Showa Denko, Japan)，管柱移動相為純水，流速 1.0 mL/min，管柱溫度 80°C。先完成 glucose 與 galactose 標準曲線繪製，之後分析樣品，每次樣品注射量為 10 μL，與單醣標準品比對滯留時間，並以波峰積分面積計算樣品的濃度。

(七) 統計分析

實驗數據以 SAS (Statistical Analysis System)

軟體進行鄧肯式多變域測驗 (Duncan, 1955)，分析各處理組間之差異，且均以 SAS 套裝軟體處理，顯著水準定為 p < 0.05。

結果與討論

一、龍鬚菜及其藻渣一般成分

以乾基計算龍鬚菜的一般成分 (Table 2)，含有粗蛋白 18.00%，粗脂肪 0.52%，粗灰分 5.21%，以及碳水化合物 76.27%。以碳水化合物減去粗纖維 8.41%，計算海藻多醣含量為 67.86%，顯示碳水化合物中的主成分為海藻多醣。相較於其他大型藻種之總碳水化合物介於 50 ~ 60% (紀, 1997)，龍鬚菜的碳水化合物含量明顯較高，做為生質酒精原料具有相對較高的優勢。本研究依據一般成分分析結果，設計先萃取龍鬚菜中水溶性的海藻多醣，剩餘藻渣含有非水溶性的纖維素，再以不同水解法處理，試驗最佳水解產糖條件，以做為之後生質酒精的發酵原料 (Fig. 1)。

二、海藻多醣最適萃取條件探討

10 g 乾燥龍鬚菜直接以 500 mL、100 °C 沸水萃取 1 hr，萃出液的總醣濃度為 2.0 mg/mL (數據未顯示於圖表)，分析藻渣的碳水化合物含量仍有 73.02% (Table 2)，顯示此萃取方法仍會有大量海藻多醣 (57.05%) 殘留於藻渣中。陳 (1986) 使用稀酸浸泡前處理法，再續以沸水萃取海藻多醣，可使其抽出率提高。本研究以酸浸泡前處理配合

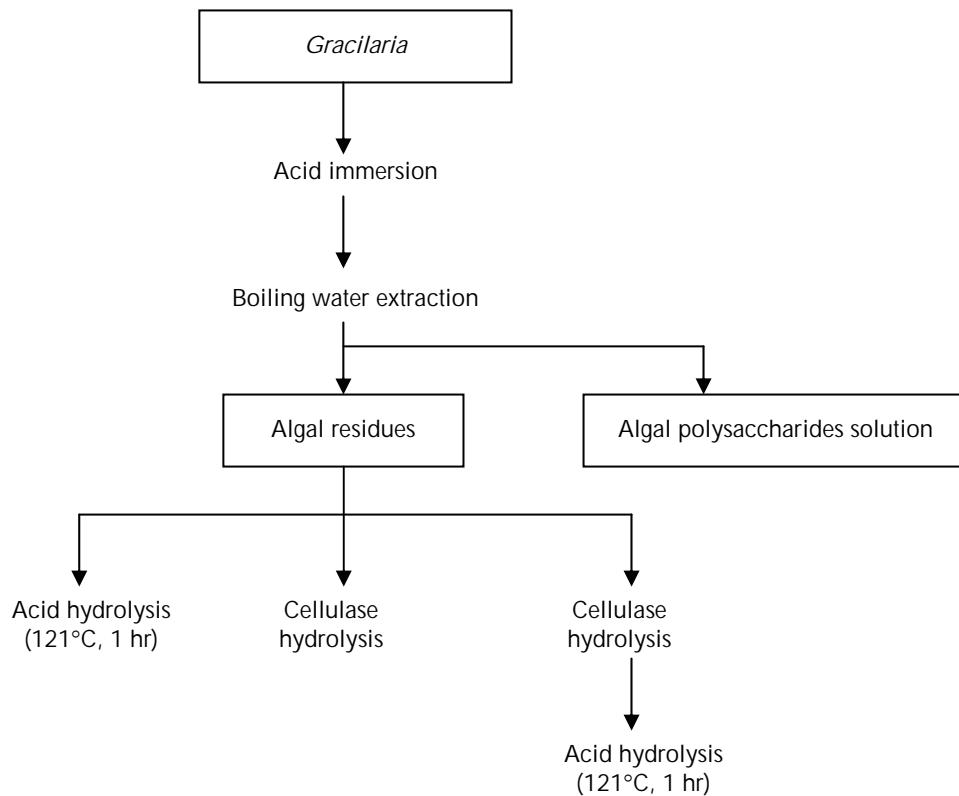


Fig. 1 Experimental scheme of algal polysaccharides extraction and algal residues saccharification of *Gracilaria* sp.

反應曲面法 (Response surface methodology), 試驗不同的稀酸浸泡前處理條件 (酸濃度與浸泡時間), 以及後續沸水萃取的時間條件, 以追求最佳的海藻多醣萃取方法。

進行預實驗以獲得所需反應變因的條件範圍; 發現酸濃度高於 0.1 N、浸泡時間超過 4 hrs 時, 海藻多醣萃取率明顯降低 (數據未顯示於圖表), 推測可能原因是龍鬚菜藻壁及 (或) 海藻多醣受到酸過度破壞, 於後續去酸過程多醣流失, 造成熱水萃取的產率降低; 另外, 沸水萃取時間大於 4 hrs 以上時, 多醣萃取率無顯著差異。

依據預實驗結果, 設計三變因反應曲面條件範圍: 酸浸泡時間 0.3 ~ 3.7 hr、酸濃度 0 ~ 0.1 N、沸水萃取時間 0.3 ~ 3.7 hr (Table 1); 分析萃取液中的總醣量做為海藻多醣萃取率的指標。實驗結果以反應曲面程式 (Myers and Montgomery, 2002) 計算後, 酸濃度、浸泡時間及沸水萃取時間, 三變因之相互關係呈現於 Figs. 2 ~ 4。

酸濃度和其他兩個變因 (Figs. 2 & 3) 的三維座標皆有波峰曲面產生, 而浸泡時間和萃取時間 (Fig. 4) 之相關性則呈一平緩曲面, 顯示酸濃度為萃取條件之主要影響因素。分析酸濃度和浸泡時間的曲面圖 (Fig. 2), 顯示多醣萃取液的總醣量, 隨著酸濃度增加而增高, 但當酸濃度超過 0.02 N 時, 總醣量隨即遞減; 同時, 0.02 N 酸濃度下, 浸泡時間增加, 總醣量也呈現下降趨勢, 最適浸泡時間是 0.3 hr, 總醣濃度可達 6.8 mg/mL, 當浸泡 3.7 hrs 時, 萃取液之總醣濃度降為 4.5 mg/mL, 顯示龍鬚菜經 0.02 N 酸浸泡處理後, 可以提高後續熱水萃取過程多醣的萃取量。此外, 與直接沸水萃取法 (總醣濃度 2.0 mg/mL) 相較, 顯示酸浸泡前處理的萃出率可以高出 3 倍以上。

酸濃度和萃取時間的曲面圖 (Fig. 3) 中, 同樣顯示酸 0.02 N 為最適濃度, 高於此濃度時, 增加萃取時間對總醣濃度並無顯著影響, 但在低於 0.02 N 時, 萃取時間和酸濃度呈現正相關, 總醣

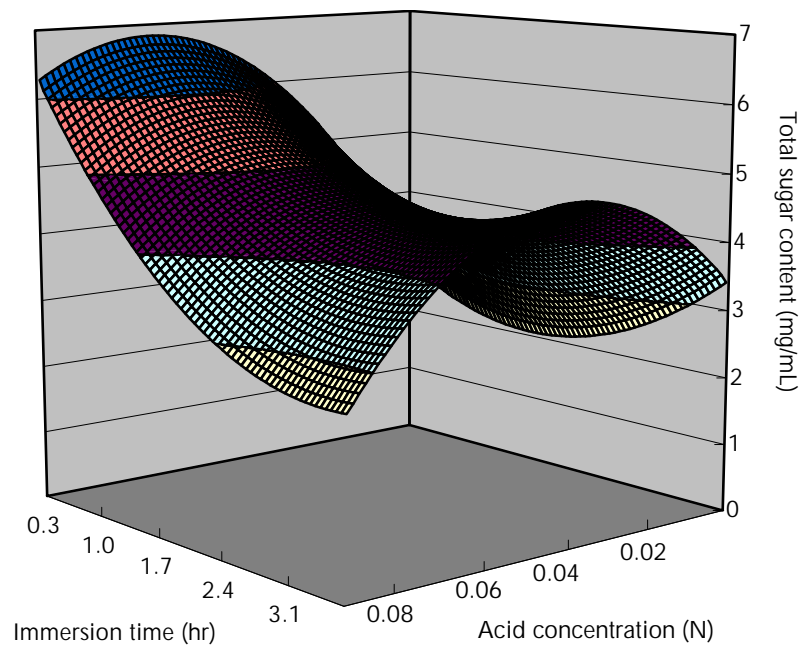


Fig. 2 Effect of acid immersion time and acid concentration on total sugar content of polysaccharide solution extracted from *Gracilaria* sp.

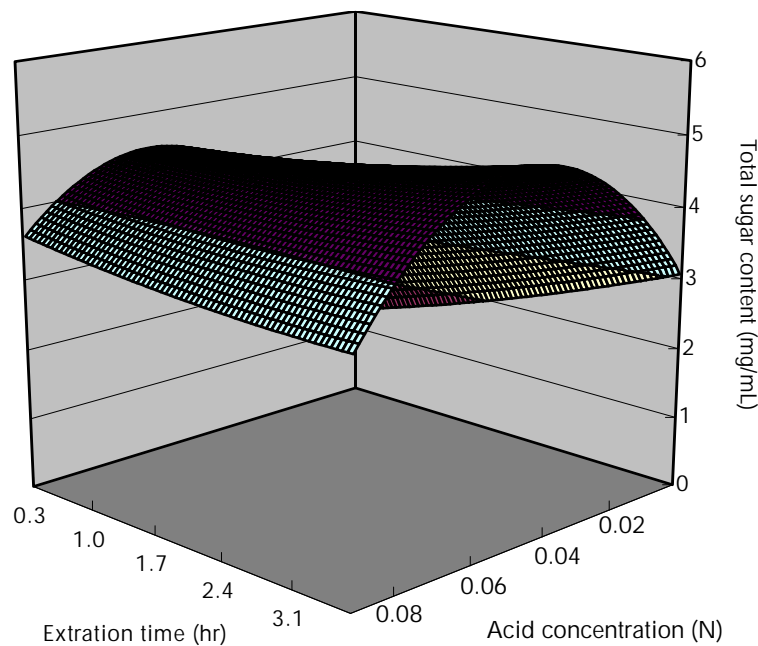


Fig. 3 Effect of boiling water extraction time and acid concentration on total sugar content of polysaccharide solution extracted from *Gracilaria* sp.

濃度隨萃取時間增加而上升。酸浸泡時間和萃取時間的曲面圖 (Fig. 4)，顯示兩者相關性較低 (圖形較平坦)。

由此反應曲面分析結果顯示，萃取龍鬚菜海藻多醣的最適方法，是將乾燥龍鬚菜以 0.02 N 酸液浸泡 0.3 hr 後，再以 100 °C 沸水萃取 0.3 hr，以此條

件進行測試，結果萃取液總醣濃度為 6.9 mg/mL，是測試條件中萃取率最高的一組，故驗證確實為最適萃取條件。殘餘藻渣進行一般成分分析，其海藻多醣含量減少至 37.02% (Table 2)，粗纖維含量增加為 23.91%，以殘留藻渣及乾燥原藻海藻多醣的重量變化量計算，此法萃取率為 64.80%。

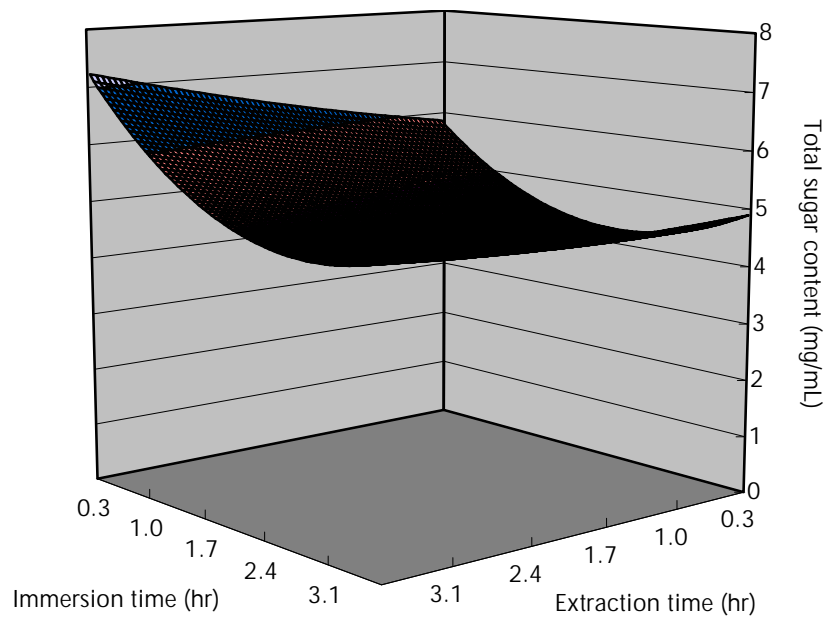


Fig. 4 Effect of acid immersion time and boiling water extraction time on total sugar content of polysaccharide solution extracted from *Gracilaria* sp.

Table 3 Glucose and galactose production yields¹ of algal residues by acid hydrolysis

Acid (N)	Glucose (mg/mL)	Glucose production yield ³ (%)	Galactose (mg/mL)	Galactose production yield (%)
0.3	12.3±0.3 ²	34.3 ^a	15.6±0.3	28.1 ^a
0.9	13.0±0.7	36.3 ^b	16.2±0.6	29.1 ^a
1.8	13.0±0.5	36.3 ^b	18.1±0.3	32.6 ^b
3.6	10.9±0.6	27.9 ^c	20.0±0.9	36.0 ^c

¹Data were obtained from three independent experimental samples

²Values are means ± SD (n = 3)

³Different superscripts within the column indicate significant difference (p < 0.05)

三、藻渣水解液的單醣產率

沸水萃取海藻多醣之後的龍鬚菜藻渣，再以酸、纖維素酶，以及合併纖維素酶與酸處理，三種水解方法探討單醣的產率，以做為轉化生質酒精的發酵原料可行性評估。纖維素酶可水解龍鬚菜藻渣的纖維素產生單醣glucose；酸水解可以同時水解龍鬚菜藻渣的纖維素及海藻多醣產生單醣glucose 及 galactose，將水解液中的醣分子種類使用高效液相層析儀 (HPLC) 分析，單醣大約在8 mins 以後出現。水解液之 HPLC 層析圖譜以標準品比對 (Fig. 5)，10 mins 的波峰為 glucose，12 mins 的波峰為 galactose。

(一) 酸水解

藻渣浸泡於0.9 N 的稀硫酸溶液，121°C 加熱水解 1 hr，其水解糖液的 HPLC 圖譜 (Fig. 6 a)，在 6~14 mins 呈現一傾斜上升的基線，以相同酸溶液的 HPLC 圖譜比對，顯示此為樣品中的酸液造成的影響，所以 glucose 及 galactose 濃度的計算方式，是以傾斜基線上波峰至波谷的面積積分，由標準曲線內插計算得到，再以藻渣原有粗纖維與海藻多醣含量，換算二者的水解率，並以統計分析是否具有顯著差異 (p < 0.05)。結果顯示於 Table 3，當水解液的酸濃度0.3 N 時，glucose 的產率 34.3%，在0.9~1.8 N之間時，glucose 產率為 36.3%，酸濃度提高至 3.6 N 時，產率顯著

降低至 27.9%，所以最適酸濃度介於 0.9 ~ 1.8 N 之間 (glucose水解濃度為13.0 mg/mL); 3.6 N 高濃度造成水解率降低，依據文獻指出glucose在高溫及酸的作用下會被分解產生羥甲基糠醛 (或羥甲基呋喃甲醛) (hydroxy methyl furfural, HMF) 物質 (Dien *et al.*, 2006), 龍鬚菜藻渣水解液經 HPLC 分析後，確實發現其中含有 HMF (資料未顯示於圖表)，所以推測為glucose被分解。Galactose (β -D-galactose 與 3,6-anhydro- α -L-galactose) 的水解產率則隨酸濃度的增加而有上升的趨勢，酸濃度 0.3 N時，產率是 28.1%，當酸濃度為 3.6 N 時，產率增加至 36.0% (水解液 galactose 濃度為 20.0 mg/mL)，並具有統計分析上的顯著差異。酸水解的glucose 與 galactose 產率並不高，藻渣的纖維素僅有36.3% 被水解產生 glucose，推測殘留於藻壁及藻細胞間的海藻多醣仍因纖維素的屏障，無法有效被酸分解。

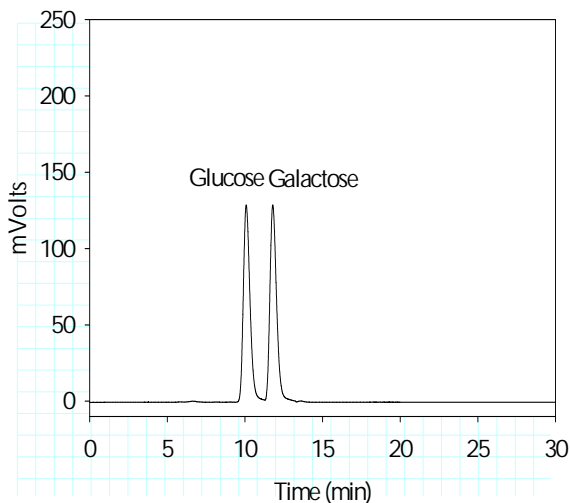


Fig. 5 HPLC Chromatogram of standard glucose and galactose solution. The analysis was conducted with column SP0810 (8.0 mm ID×300 mm, Showa Denko Co.), pump LC-9A (Kyoto Co.), and with a refractive index detector (Perkin Elmer® Series 200). The mobile phase was ddH₂O, with a flow rate of 1.0 mL/min (the tube was controlled at 80 °C).

(二) 纖維素酶水解

藻渣以1% 纖維素酶於 50 °C 恆溫水浴槽水解 48 hrs。其 HPLC 分析圖譜列於 Fig. 6b，glucose 濃度約為 32.2 mg/mL，以水解液中藻渣

固形物含量 15% 及藻渣粗纖維比例換算，其纖維素水解產生 glucose 的產率為 90.0%；水解液未能檢出 galactose，顯示由 β -D-galactose 與 3,6-anhydro- α -L-galactose 共同聚合的海藻多醣仍保留於藻渣中。

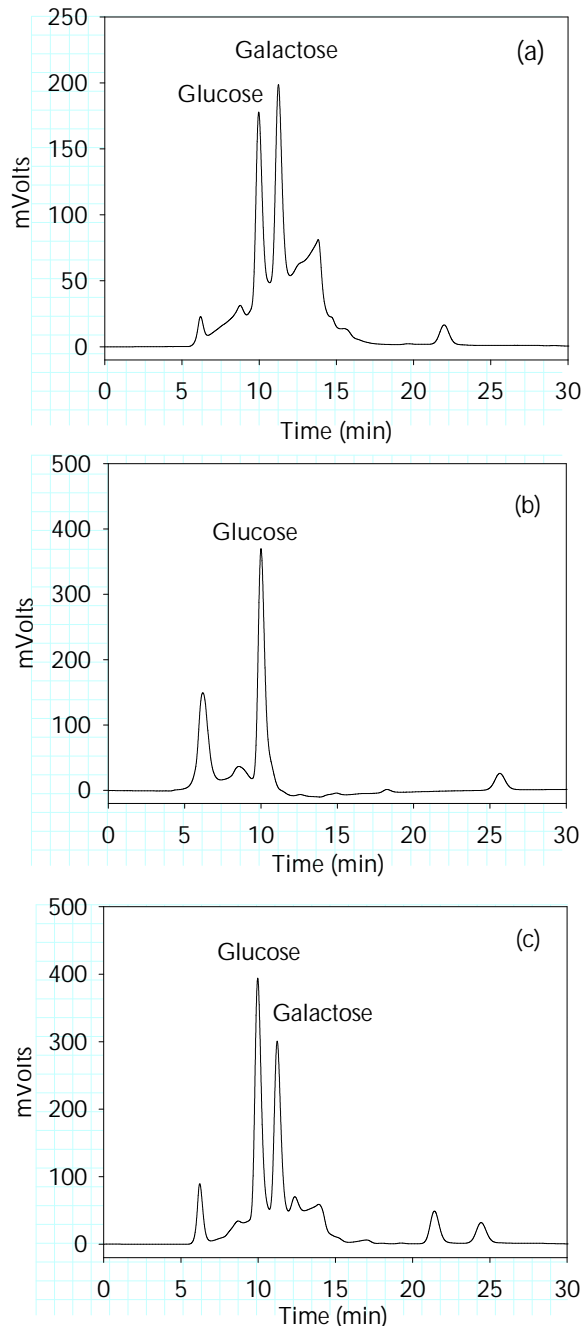


Fig. 6 HPLC Chromatograms of the hydrolysate of algal residues. Hydrolysis treatments: (a) acid, (b) cellulase, (c) cellulase and then acid. The analysis was conducted with column SP0810 (8.0 mm ID×300 mm, Showa Denko Co.), pump LC-9A (Kyoto Co.), and with a refractive index detector (Perkin Elmer® Series 200). The mobile phase was ddH₂O, with a flow rate of 1.0 mL/min (the tube was controlled at 80°C).

(三) 纖維素酶水解後以酸水解

藻渣以 0.9 ~ 1.8 N 的酸溶液水解，其 glucose 水解率僅 36.3%，若僅以纖維素酶水解，則無法分解海藻多醣得到 galactose 與 3,6-anhydro- α -L-galactose，所以將龍鬚菜藻渣先以纖維素酶水解後，再以酸水解，期能將纖維素結構破壞，使酸水解時的海藻多醣分解率提高，增加龍鬚菜藻渣的多醣糖化比例。

取經 1.0% 纖維素酶處理的藻渣水解液，以高濃度硫酸調配至 0.9 N，於 121 加熱 1 hr 進行酸水解，HPLC 分析圖譜列於 Fig. 6c，由 glucose 與 galactose 濃度換算其水解產率，分別為 95.0% 與 43.5%。由於龍鬚菜藻渣的醣類主要為 glucose 聚合的纖維素及 galactose 與 3,6-anhydro- α -L-galactose 共同聚合的海藻多醣，經纖維素酶處理後 95.0% 的纖維素被水解產生 glucose，殘留於藻壁的海藻多醣可能被釋出後再經酸分解產生 galactose，比較此處理 (Fig. 6c) 與單獨酵素水解處理的圖譜 (Fig. 6b)，發現前者出現於 6 mins 的波峰明顯變小，所以，6 mins 波峰可能是含有水溶性 galactose 多醣或寡醣的聚合物。

結 論

本研究以酸浸泡乾燥龍鬚菜前處理，可以有效提高海藻多醣萃出率，以反應曲面分析最適萃取條件所得萃取率為 64.8%，其萃取液總醣濃度為直接沸水萃取法的3倍以上；殘留於藻渣的碳水化合物，可經由纖維素酶合併酸水解處理，分解出酒精酵母可利用的單醣 glucose 及 β -D-galactose，glucose 以藻渣粗纖維量、galactose 以藻渣海藻多醣量為基準，前者水解產率可達 95.0%，後者約為 43.5% (β -D-galactose 及 3,6-anhydro- α -L-galactose)，以龍鬚菜藻渣製生質酒精，應該具有相當高的可行性。

參考文獻

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 碩士學位論文, 台北, 30-45.

- 紀明侯 (1997) 海藻化學. 中國科學出版, 北京, 100-275.
- 翁子傑 (2007) 生產生質酒精之醱酵製程開發. 私立元智大學生物科技暨生物資訊研究所 碩士學位論文, 新竹, 8-15.
- 陳茂松 (1986) 龍鬚菜加工試驗 - 以預先浸酸與直接加酸法抽取洋菜成分之比較. 水產試驗所試驗報告, 18: 1-5.
- A.O.A.C. (1995) Official Methods of Analysis, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Araki, C. (1956) Structure of the agarose constituent of agar-agar. Bull. Chem. Soc. Japan, 29: 543-544.
- Aresta, M., A. Dibenedetto and G. Barberio (2005) Utilization of macro-algae for enhanced CO₂ fixation and biofuels production: Development of a computing software for an LCA study. Fuel Processing Technol., 86: 1679-1693.
- Campo, I., I. Alegria, M. Zazpe, M. Echeverria and I. Echeverria (2006) Diluted acid hydrolysis pretreatment of agri-food wastes for bioethanol product. Ind. Crops Products, 24: 214-221.
- Dien, B. S., J. G. Jung, K. P. Vogel, M. D. Casler, F. S. Lamb, L. Iten, R. B. Mitchell and G. Sarath (2006) Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canary grass and switch grass. Biomass and Bioenergy, 30: 880-891.
- Dubois, M. K. A., J. K. Gilles, P. A. Hamilton and F. Rebers (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28: 350-356.
- Duncan, D. B. (1955) Multiple-range and multiple F tests. Biometrics, 11: 1-42.
- Horn, S. J., I. M. Aasen and K. Ostgaard (2000) Ethanol production from seaweed extract. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 25: 249-254.
- Jeffrey, D. K., R. Jamie, J. B. Rodney, N. S. John and D. M. Shawn (2004) Characterization of a unique ethanologenic yeast capable of fermenting galactose. Enzyme Microbiol. Technol., 35: 242-253.
- Jorg, P. and T. Sascha (2008) Promoting biofuels: Implications for developing countries. Energy Policy, 36: 1538-1544.
- Marinho-Soriano, E. and E. Bourret (2005) Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). Bioresource Technol., 96: 379-382.

- Myers, R. H. and D. C. Montgomery (2002) *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, second edition. John Wiley and Sons, New York, U.S.A., 10-105.
- Saha, B. C., L. B. Iten, M. A. Cotta and W. Y. Victor (2005) Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, 40: 3693-3700.
- Tako, M., M. Higa, K. Medoruma and Y. Nakasone (1999) A highly methylated agar from Red Seaweed. *Botanica Marina*, 42: 513-517.
- Usov, A. I. (1998) Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. *Food Hydrocolloids*, 12: 301-308.
- Wilkison, J. F. (1949) The pathway of the adaptive fermentation of galactose by yeast. *Biochemistry*, 44: 460-467.

Algal Polysaccharides Extraction and Algal Residues Saccharification of *Gracilaria* sp.

Chi-Chung Fan, Ya-Lin Lee, Ya-Wen Lu and Chun-Heng Wu*

Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

Gracilaria sp. is the most productive alga cultured in Taiwan. It contains 76.27% carbohydrate (dry-base weight, 8.41% crude fiber among them). After algal polysaccharides extraction, the remaining residues could be used as the source of bioethanol through saccharification treatment. The response surface methodology was applied to obtain an optimal agar extraction method that dried *Gracilaria* was immersed in 0.02-N sulfuric acid solution for 0.3 hr, and then extracted with boiling water (100°C) for 0.3 hr. Based on the algal polysaccharides content in the collected *Gracilaria* sp., the algal polysaccharides extraction rate was calculated to be 64.8%; this method has threefold higher extraction rate than the direct boiling water extraction method. The residues of algae residues still contained a high amount of carbohydrate (dry-base weight, 60.93%, which contained 23.91% cellulose). The algal residues were treated with acid, cellulase or cellulase-then-acid to assess their saccharification efficiencies. The results showed that the highest saccharification efficiency was observed when the algal residues were treated with 1.0% cellulase and then treated with 0.9 N sulfuric acid, which was heated in an autoclave at 121°C for 1 hr. Based on the algal residues crude fiber and algal polysaccharides, the hydrolysis yields of glucose and galactose were calculated to be 95.0% and 43.5%, respectively.

Key words: *Gracilaria*, algal polysaccharide, cellulase, algal residue, saccharification

*Correspondence: 199, Hou-lh Rd., Keelung 202, Taiwan, TEL: (02) 2462-3792; Fax: (02) 2463-2677; E-mail: chwu@mail.tfrin.gov.tw