

石蓴以 *Saccharomyces cerevisiae* 進行批次與饋料批次發酵 生產生質乙醇之條件探討

黃美瑩¹ · 李樵^{2,3} · 賴巾玥² · 潘崇良^{2,3*}

¹行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

²國立臺灣海洋大學食品科學系

³國立臺灣海洋大學藻類研究中心

摘要

本研究以酵母菌發酵石蓴多醣酵素水解液，探討石蓴 (*Ulva lactuca*) 生質乙醇之生產條件。石蓴粉末 (5%, w/v) 依序以 0.4 N HCl/121°C/20 min、纖維素酶、 α -澱粉酶、以及 MA103 與 MAEF108 粗酵素液處理得到石蓴多醣水解液。石蓴多醣水解液的總糖量為 7.39 mg/ml、還原糖量 8.40 mg/ml、與鹽濃度為 5.0%。石蓴多醣水解液接種 (10%, v/v) *S. cerevisiae* BCRC21685 於室溫下進行批次發酵 72 h 後，發酵液中之乙醇濃度、乙醇產率、及還原糖利用率分別為 0.91%、19.34 g/100 g 石蓴 (粉末)、及 53.50%。石蓴多醣水解液接種 (10%, v/v) *S. cerevisiae* BCRC21685 進行饋料批次發酵 120 h 後，發酵液中之乙醇濃度、乙醇產率、及還原糖利用率分別為 1.02%、21.76 g/100 g 石蓴 (粉末)、與 58.75%。饋料批次發酵可進一步提升自石蓴產製生質乙醇之產率，對於未來拓展海洋生質燃料之發展深具潛力。

關鍵詞：石蓴、酵素水解、批次發酵、饋料批次發酵、酵母菌、生質乙醇

前言

藻類可分為大型海藻與微細藻二大類 (Percival, 1979)。藻類的光合作用效率高於陸生植物，因此藻類可利用光合作用把空氣中的 CO₂ 固定 (Bae *et al.*, 2011)。大型海藻容易培養在海水中，可以節省能源、節省淡水及有捕捉 CO₂ 的能力，其捕捉 CO₂ 的能力優於陸生植物 (Dismukes *et al.*, 2008)。

大型海藻中的主要成分是多醣類物質，占乾重的 40 ~ 70% (Khambhaty *et al.*, 2011; Lee and Lee, 2011)。石蓴 (*Ulva lactuca*) 之總固形物 (Total solid, TS) 含量為 9.6 ~ 20.4%，其組成分析為 27% 蛋白質/TS、0.3% 脂質/TS、與 62% 碳水化合物 / TS (Ortiz *et al.*, 2006)。石蓴含水溶性石蓴硫

酸多醣 (Ulvan) 與非水溶性纖維素 (Cellulose) 為主，其次為木糖葡聚糖 (Xyloglucan) 與葡萄糖酸聚糖 (Glucuronan) (Lahaye and Robic, 2007)。石蓴之硫酸多醣之組成：總糖為 65.4%、硫含量為 17.4%、與糖醛酸 (uronic acid) 含量為 17.2% (Sathivel *et al.*, 2008)。然而石蓴熱水萃取液裡的單醣來自於本身的多醣降解，因此含醣量高之石蓴是適合生產生質乙醇之料源 (Adams *et al.*, 2009)。

生質乙醇被視為有潛力之液體燃料，其市場成長從 1975 年少於 10 億公升增長到 2006 年超過 39 億公升，預計到 2015 年達到 100 億公升 (Khambhaty *et al.*, 2012)。生質乙醇作為汽油的替代燃料，生質乙醇通常以 5 ~ 15% 與汽油混合，可在不修改現有汽車引擎的情況下使用，也可以完全替代汽油，作為汽車燃料。使用生質乙醇的汽油辛烷值高且較潔淨。此外，汽車引擎燃燒的乙醇是由二氧化碳 (CO₂) 經植物光合作用轉化的生質而來，形成封閉系統，在這個系統中循環利用

*通訊作者 / 基隆市北寧路 2 號 ; TEL: (02)2462-2192;
E-mail: b0037@ntou.edu.tw

CO₂，淨排放量是零 (林與李，2009)。因此，生質乙醇可減少二氧化碳的排放，緩和溫室效應所帶來的衝擊 (John *et al.*, 2011)。

Liu *et al.* (2010) 以酸去除木質纖維素，再以鹼中和之玉米桿進行批次發酵與饋料批次發酵，分別得到 53.2 g/L 乙醇與 57.6 g/L 乙醇，顯示饋料批次發酵之乙醇產率較批次發酵者為高。Chen *et al.* (2011) 利用石蓴做為原料，進行批次發酵，已可獲得生質乙醇，產率為 12.01 g/100 g 乾藻。吳 (2012) 以製程 K 水解馬尾藻後，進行批次發酵與饋料批次發酵，分別得到 25.48 g/100 g 乾藻與 26.67 g/100 g 乾藻之乙醇產率。Hong *et al.* (2014) 分別使用紅藻 *Gelidium amansii*、褐藻 *Laminaria japonica* 與綠藻 *Codium fragile* 以酸與酵素進行水解，隨後進行發酵生產生質乙醇，在第三天時，乙醇產率達到最高，分別約為 11.0 g/100 g 乾藻、8.0 g/100 g 乾藻與 7.0 g/100 g 乾藻。Meinita *et al.* (2015) 分別以 0.2 M HCl 與 0.2 M H₂SO₄ 以 130°C 水解 *G. latifolium* 15 分鐘後進行批次發酵，分別得到 18.20 g/L 與 8.58 g/L 之生質乙醇，產率約為 36.4 g/L 與 17.16 g/L。Kim *et al.* (2015) 使用 *G. amansii* 分別以 cellulase 與 β -glucosidase 水解並進行批次發酵，最終得到 17.35 g/L 之生質乙醇，產率約為 34.70 g/100 g 乾藻。因此，本研究參考吳 (2012) 所述自馬尾藻產製生質乙醇之最適生產條件 (製程 K)，改以石蓴為原料，經熱酸、纖維素酶、 α -澱粉酶與 *A. salmonicida* MAEF108 與 *P. vesicularis* MA103 粗酵素液等處理後得到之石蓴多醣水解液，再以單一酵母菌株進行批次發酵與饋料批次發酵，探討自石蓴多醣水解液產製生質乙醇之反應條件。

材料與方法

一、試驗菌株

(一) 細菌菌株

採用本實驗室分離自海水中之海洋細菌分離株 *Pseudomonas vesicularis* MA103 與 *Aeromonas salmonicida* MAEF108 經以石蓴誘導後產出多種海藻多醣水解酵素之粗酵素液 (Wu and Pan, 2004)。

(二) 酵母菌菌株

酵母菌菌株 *Saccharomyces cerevisiae* BCRC21685 購自財團法人食品工業發展研究所 (Food Industry Research and Development Institute, FIRDI) 之生物資源保存與研究中心 (Bioresources Collection and Research Center, BCRC)。

二、以石蓴粉末誘導 *P. vesicularis* MA103 與 *A. salmonicida* MAEF108 粗酵素液

(一) 菌株之保存

A. salmonicida MAEF108 與 *P. vesicularis* MA103 分別接種至 100 ml MB-Ulv 中，在 26°C 下以 150 rpm 振盪培養，當菌液培養至分光光度計於波長 600 nm 下測定吸光值 (OD_{600nm}) 達 1.0~1.2 時 (菌數約 8.6~9.0 log CFU/ml)，取 0.7 ml 菌液至含 0.7 ml 已滅菌之甘油保存管中，將菌液與甘油混合均勻 (1:1) 後，置於 -80°C 凍藏櫃中保存 (Wu and Pan, 2004)。

(二) 菌株之活化

自保存於 -80°C 凍藏櫃中之 *A. salmonicida* MAEF108 與 *P. vesicularis* MA103 保存管中分別勾取一接種環，三區劃線於 MA 上，在 26°C 下培養 24 h (一次活化)。然後以接種環勾取一獨立分離菌落於新的 MA 上進行三區劃線，在 26°C 下培養 24 h (二次活化)。再以接種環勾取二次活化之獨立分離菌落分別接種至 100 ml MB-Ulv 中，在 26°C 下以 150 rpm 振盪培養至 OD_{600nm} = 0.8 (菌數約 7.8 log CFU/ml)，然後進行後續實驗 (Wu and Pan, 2004)。

(三) 石蓴粉末誘導 *P. vesicularis* MA103 與 *A. salmonicida* MAEF108 之粗酵素液的製備

以 0.3 g 石蓴粉末溶於 99.7 ml Marine broth 培養基並攪拌均勻，製作成 MMB-Ulv 培養基。分別將 1% *P. vesicularis* MA103 與 *A. salmonicida* MAEF108 接種至 MMB-Ulv 培養

基中，並在 26°C 下以 150 rpm 振盪培養 48 h (Wu and Pan, 2004)。在 4°C 下以 15,400 ×g 離心 30 min，收集上清液以 0.22 μm 孔徑濾膜過濾備用。粗酵素液分別命名 MAEF103-Ulva 與 MA108-Ulva 為 MA103 與 MAEF108 誘導粗酵素液。

三、石蓴熱萃多醣水解條件

(一) 石蓴熱酸萃取多醣水解液之製備

5% 石蓴粉末以 0.4 N HCl 於滅菌釜中以 121°C 熱萃 20 min，待冷卻至室溫後進行後續實驗 (楊, 2011)。

(二) 石蓴多醣水解液水解成寡醣水解液之水解製程

考量降低生產成本與降低消耗能源所致之碳足跡 (carbon footprint)，本研究中嘗試以室溫反應條件與減少酵素使用量，而延長 MAEF103/MA108 粗酵素液之水解反應時間以及增加水解反應之總體積。將製備好之石蓴熱酸萃取多醣液調整 pH 值至 4.50，加入 41,040 U 纖維素酶於室溫下反應 48 h，後續加入 91,960 U α-澱粉酶於室溫下反應 48 h，再加入 MAEF103 與 MAEF108-Ulva 粗酵素液至總體積到 6,000 ml，於室溫下反應 24 h。測定石蓴多醣水解液之總糖量、還原糖量、鹽度、與 pH 值。

四、酵母菌菌株發酵乙醇

(一) 菌株保存

酵母菌菌株接種至 10 ml YPD broth，在 25°C 下靜置培養，當菌液培養至分光光度計於波長 600 nm 下測定吸光值 (OD_{600nm}) 達 1.2 ~ 1.4 時 (菌數約 7.3 ~ 7.5 log CFU/ml)，取 0.7 ml 之菌液至含 0.7 ml 已滅菌甘油 (50%) 保存管中，將菌液與甘油混合均勻，置於 -80°C 凍藏櫃中保存 (楊, 2011)。

(二) 菌株活化

自保存於 -80°C 凍藏櫃中之酵母菌保存管勾取一接種環，三區劃線於 YPD agar 上，25°C 下

培養 48 h (一次活化)。然後以接種環勾取一獨立分離菌落於新的 YPD agar 上三區劃線，25°C 下培養 48 h (二次活化)。再以接種環分別勾取二次活化之獨立分離菌落接種至 10 ml YPD broth 中，在 25°C 下靜置培養至 OD_{600nm} = 1.0，然後進行後續實驗 (楊, 2011)。

(三) 石蓴多醣水解液之批次發酵試驗

參考吳 (2012) 之批次發酵方法，量取 100 ml 石蓴多醣水解液至發酵瓶中，接種 10% (v/v) *S. cerevisiae* BCRC21685 於室溫避光靜置發酵 24 ~ 120 h，期間取樣分析 pH 值、鹽度、殘留總糖量、殘留還原糖量、酵母菌量、還原糖利用率、乙醇濃度與乙醇產率。

(四) 石蓴多醣水解液之饋料批次發酵試驗

參考吳 (2012) 之饋料批次發酵方法，量取 50 ml 石蓴多醣水解液至發酵瓶中，接種 10% (v/v) *S. cerevisiae* BCRC21685 於室溫避光靜置發酵 24 ~ 120 h，進行饋料批次發酵，分別於發酵 72 h 與 96 h 各加入 25 ml 石蓴多醣水解液 (還原糖濃度為 35.78 mg/ml)，使最後石蓴多醣水解液之總發酵體積為 100 ml，期間取樣分析 pH 值、鹽度、殘留總糖量、殘留還原糖量、酵母菌量、還原糖利用率、乙醇濃度、與乙醇產率。

五、分析方法

(一) 總糖量測定

修飾 Dubois *et al.* (1956) 之方法，將樣品用微離心機在室溫下以 16,000 ×g 離心 5 min 後，取上清液，上清液以二次純水稀釋到適當濃度後，取 0.2 ml，加入 0.2 ml 5% (w/v) 酚，再加入 1.0 ml 18 N 之濃硫酸，混勻後在室溫下靜置反應 20 min。於波長 480 nm 下測定吸光值 (OD_{480nm})，並以鼠李糖 (rhamnose, Sigma) 作為標準糖，建立出標準檢量曲線，得以換算出樣品之總糖量 (mg/ml)。

(二) 還原糖量測定

修飾 Miller (1959) 之方法，將樣品用微離心機在室溫下以 16,000 ×g 離心 5 min 後取上清液，

上清液以二次純水稀釋到適當濃度後取 0.5 ml，加入 0.5 ml DNS 試劑，混勻後在 100°C 沸水浴中加熱反應 10 min。冷卻後加入 1 ml 二次純水混勻，於波長 546 nm 下測定其吸光值 (OD_{546nm})，以鼠李糖作為標準糖，建立標準曲線，換算出樣品之還原糖量 (mg/ml)。

(三) 酵母菌量測定

修飾楊 (2011) 之方法，將酵母菌菌液以 0.1% (w/v) peptone water 稀釋到適當濃度後，取 0.1 ml 稀釋液均勻塗抹於 YPD agar 上，25°C 下培養 48 h 後，計數 YPD agar 上之酵母菌菌落數，經過換算求得酵母菌量 (Log CFU/ml)。

(四) 氣相層析(GC)－乙醇濃度測定

修飾 Rose (1977) 與 Wang et al. (2004) 之方法，氣相層析儀為 GC-14A (Shimadzu)，氣相層析管柱為 10% Carbowax 80/100 mesh 的玻璃管柱 (3.2 × 210 mm) (Shimadzu)。空氣流速為 300 ml/min，氮氣流速為 40 ml/min，氫氣流速為 30 ml/min。管柱恆溫箱起始溫度為 40°C，維持 2 min，以 10°C/min 升溫，結束溫度為 190°C，維持 3 min。注射器溫度為 210°C，火焰離子偵測器溫度為 280°C。

修飾楊 (2011) 之方法，以 0.1% (v/v) 正丁醇作為內部標準品，將乙醇標準品 [0.5 ~ 3.0% (v/v) 無水乙醇] 與正丁醇以 1:1 比例混合後，取 1 µl 混合液經氣相層析儀測定出波峰之面積比值 (乙醇/正丁醇)，建立出標準曲線。樣品與正丁醇以 1:1 之比例混合，測定波峰面積比值，利用乙醇標準曲線換算出樣品中之乙醇濃度 (%，v/v)，計算公式如下：

$$WA' = WA \times \frac{AA'}{AA} \times \frac{AI}{AI'}$$

WA'：樣品乙醇濃度 (%)

WA：標準品之乙醇濃度 (%)

AA'：樣品混合液中之乙醇波峰面積

AA：標準品混合液中之乙醇波峰面積

AI'：樣品混合液中之丁醇波峰面積

AI：標準品混合液中之丁醇波峰面積

(五) 乙醇產率計算

將樣品所測定出之乙醇濃度 (%，v/v) 乘以總體積 (ml) 乘以乙醇密度 (0.8 g/ml) 除以石蓴粉末重量，再乘以 100，求得乙醇產率 (g/100 g) (吳, 2012)。

(六) 超過濾 (Ultrafiltration, UF)

參考 Bauer et al. (2005) 與 Mota et al. (2013) 之方法，將石蓴多醣水解液或發酵液以 3 kDa 離心式超過濾裝置 (Amicon® Ultra-15 centrifugal units, Millipore) 於 4,000 ×g 離心 30 min，收集 3 kDa 分子量以下之區分液。並將該區分液儲放於 4°C 冷藏櫃中備用以進行後續實驗。

結果與討論

一、以石蓴粉末誘導 *P. vesicularis* MA103 與 *A. salmonicida* MAEF108 粗酵素液

Figure 1 中顯示同時加入 1% *P. vesicularis* MA103 與 1% *A. salmonicida* MAEF108 在誘導粗酵素液之過程中，隨著反應時間的增加，培養液之吸光值 (OD_{600nm}) 由 0.08 ± 0.02 增加至 1.43 ± 0.02、總糖量由 0.00 ± 0.00 mg/ml 增加至 0.12 ± 0.01 mg/ml、與 pH 值由 8.06 ± 0.01 增加至 8.44 ± 0.01，但未測得還原糖含量之變化。

在誘導粗酵素液之過程中，同時加入 1% *P. vesicularis* MA103 與 1% *A. salmonicida* MAEF108，隨著反應時間的增加 (0 ~ 48 h)，澱粉酶之活性由 0.00 ± 0.00 U 增加至 1.35 ± 0.02 U，聚木糖酶之活性由 0.00 ± 0.00 U 增加至 0.93 ± 0.02 U，纖維素酶之活性由 0.00 ± 0.00 U 增至 0.15 ± 0.00 U，κ-鹿角菜膠酶之活性由 0.00 ± 0.00 U 增加至 0.01 ± 0.00 U 與 ι-鹿角菜膠酶之活性由 0.00 ± 0.00 U 增加至 0.02 ± 0.00 U。洋菜酶之活性在誘導 24 h 後，由 0.00 ± 0.00 U 增加至 0.10 ± 0.01 U，但是到 48 h 時，則降低至 0.17 ± 0.00 U。但是 λ-鹿角菜膠酶與褐藻膠裂解酶不具有活性 (Fig. 2)。因此可得知 1% *P. vesicularis* MA103 與 1% *A. salmonicida* MAEF108 粗酵素液中，以澱粉酶具較高活性

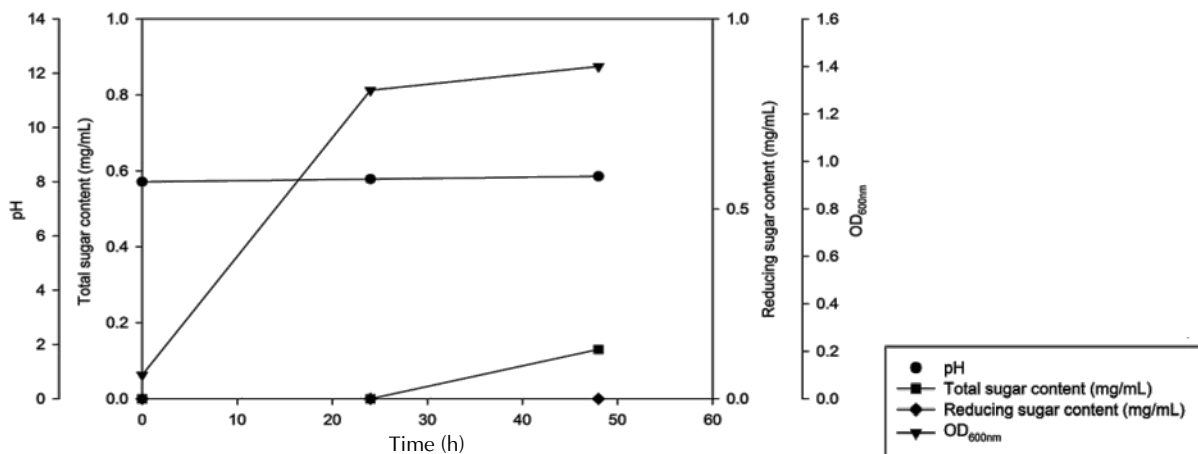
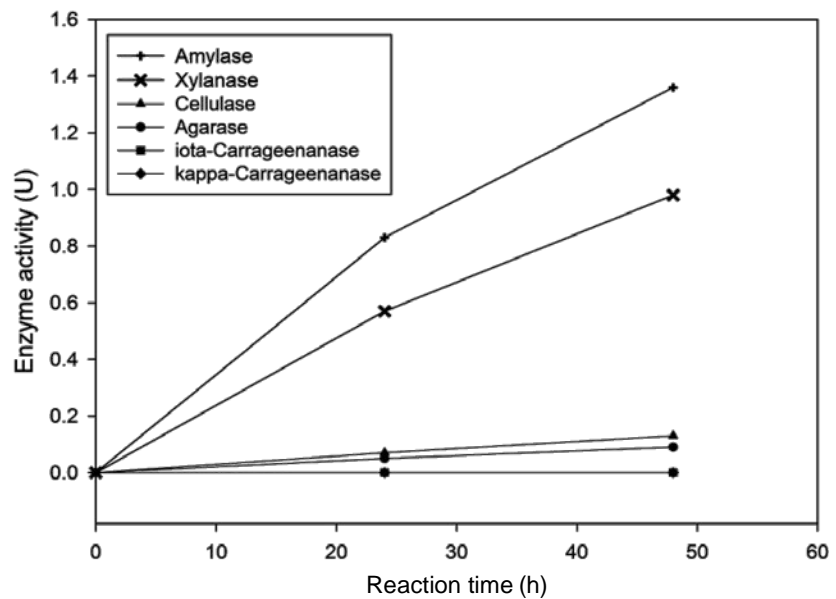


Fig. 1 The analyses results for total sugar content, reducing sugar content, OD_{600nm} , and pH value of crude enzyme solution induced by 1% *Pseudomonas vesicularis* MA103 and 1% *Aeromonas salmonicida* MAEF108¹ with *Ulva lactuca* powder² (0.3%). [¹0.3 g of the *U. lactuca* powder to 99.7 ml Marine broth medium, added *P. vesicularis* MA103 and *A. salmonicida* MAEF108 were added to reach the final starter concentration at 1%, and then incubated at 26°C for 0, 24, and 48 h; ²Each value is mean \pm standard deviation (n = 3)].

Fig. 2 The analyses results for enzyme activity in the crude enzyme solution induced by 1% *Pseudomonas vesicularis* MA103 and 1% *Aeromonas salmonicida* MAEF108 with *Ulva lactuca* powder (0.3%)¹. [¹0.3 g of the *U. lactuca* powder to 99.7 ml Marine broth medium, added *P. vesicularis* MA103 and *A. salmonicida* MAEF108 were added to reach the final starter concentration at 1%, and then incubated at 26°C for 0, 24, and 48 h; ²Each value is mean \pm standard deviation (n = 3)].



(1.35 ± 0.02 U), 木聚醣酶次之 (0.93 ± 0.02 U)。由結果可得知，隨著反應時間的增加，菌生長的愈好、總糖量、pH、與酵素活性增加，但是無還原糖。Mandels and Reese (1957) 指出，以多醣水解產物作為誘導物質能誘導出其相對之多醣酵素但是酵素產率較低。

Wu and Pan (2004) 將紫菜多醣以 *P. vesicularis* MA103 與 *A. salmonicida* MAEF108 水解，經 Sephadex G-10 膠過濾層析分離出分子

量為 324、631、與 937 Da 的 Neoagarobiose (N2)、Neoagarotetraose (N4) 及 Neoagarohexaose (N6) 等新洋菜寡醣波峰。以石蓴誘導 *P. vesicularis* MA103 與 *A. salmonicida* MAEF108 可誘導出洋菜酶、聚木醣酶、澱粉酶、鹿角菜膠酶、與纖維素酶，推測與其石蓴硫酸多醣、纖維素、木糖葡聚醣與澱粉組成之單醣含有半乳糖、葡萄糖、與木糖有關。

Table 1 The analyses results for total sugar content, reducing sugar content, salinity, and pH value in the *Ulva lactuca* polysaccharides hydrolysate during hydrolysis of *U. lactuca* powder (5%)

Procedure ¹	Total sugar content (mg/ml)	Reducing sugar content (mg/ml)	Salinity (psu ⁷)	pH	Total liquid volume (ml)
Hot HCl extraction ²	4.64 ± 0.06 ^{6d}	7.35 ± 0.01 ^d	39.00 ± 1.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^d	4,500
Cellulase hydrolysis ³	8.61 ± 0.08 ^b	10.20 ± 0.03 ^b	55.00 ± 0.01 ^a	4.80 ± 0.01 ^b	4,599
α -Amylase hydrolysis ⁴	9.11 ± 0.01 ^a	13.59 ± 0.01 ^a	54.00 ± 0.01 ^b	4.75 ± 0.01 ^c	4,600
MA103/MAEF108 crude enzymes hydrolysis ⁵	7.39 ± 0.01 ^c	8.40 ± 0.01 ^c	50.00 ± 0.01 ^c	6.27 ± 0.01 ^a	6,000

¹Procedure included the sequential treatment of *U. lactuca* polysaccharides solution with hot HCl extraction, cellulase hydrolysis, α -amylase hydrolysis, and MA103/MAEF108 crude enzymes for the hydrolysis of various *U. lactuca* polysaccharides.

²225 g (*Ulva* powder) of *U. lactuca* powder was added to 4,275 ml pure water, and 12 N HCl was added to reach the final HCl concentration at 0.4 N, after which the solution was treated in an autoclave at 121°C for 20 min.

³41,040 U cellulase [1,520 U/g; 1 unit (U) = 1 μ mole glucose/min] was added and reacted at room temperature for 24 h (initial pH = 4.50).

⁴91,960 U α -amylase [22,000 U/g; 1 unit (U) = 1 mg maltose/min] was added and reacted at room temperature for 24 h.

⁵952 U MA103 crude enzymes [1.36 U/ml; 1 unit (U) = 1 μ mole glucose/min] and 546 U MAEF108 crude enzymes (0.78 u/ml) were added and reacted at room temperature for 24 h.

⁶Each value is mean \pm standard deviation (n = 3). Different superscript letters in the same column indicate significantly different values ($p < 0.05$).

⁷psu = practical salinity unit.

二、石蓴多醣水解液之水解

5% 石蓴粉末先以 0.4 N HCl 於 121°C 熱萃 20 min，依序以纖維素酶、 α -澱粉酶及 MA103 與 MAEF108 粗酵素液於室溫下製作石蓴多醣水解液反應過程中之總糖量、還原糖量、鹽濃度、與 pH 值等之變化均整理於 Table 1。由其中可觀察到石蓴多醣水解液的總糖量由 4.64 \pm 0.06 mg/ml 上升到 7.39 \pm 0.01 mg/ml，還原糖量由 7.35 \pm 0.01 mg/ml 上升到 8.40 \pm 0.01 mg/ml，鹽濃度由 3.9 \pm 0.1% 上升到 5.0 \pm 0.01% 與 pH 值由 0.00 \pm 0.00 上升到 6.27 \pm 0.01。由結果可知石蓴多醣水解液的總糖量與還原糖量隨著水解步驟的增加而增加。此製程所釋放之總糖量與還原糖量比吳 (2012) 從馬尾藻粉末水解出來的總糖量與還原糖量低，推測可能是因為酵素添加量減少且不在適當溫度下反應，因此影響了水解效果。而與 Chen *et al.* (2011) 比較，此製程因為沒有控制在最適反應溫度下，並且減少酵素添加量進行水解，因此總糖量與還原糖量分別比較少。

Hong *et al.* (2014) 分別使用紅藻 *Gelidium amansii*、褐藻 *Laminaria japonica*、與綠藻 *Codium fragile* 以酸與酵素進行水解並分析 glucose 含量，發現以 0.2 M HCl 處理產生之 glucose 與 galactose 量最高，但是發酵抑制物 HMF 的量也最高，而 0.4 M HCl 處理產生之 glucose 與 galactose 量次高，但是發酵抑制物 HMF 的量反而降低了 7 倍，故本研究以 0.4 N 處理是較為恰當的。

三、*S. cerevisiae* BCRC21685 (10%) 接種於石蓴多醣水解液之批次發酵試驗

接種 10% (v/v) *S. cerevisiae* BCRC21685 於石蓴多醣水解液中，在室溫避光靜置批次發酵 24 ~ 120 h 發酵液中之殘留總糖量、殘留還原糖量、還原糖利用率、乙醇濃度、與乙醇產率如 Table 2 所示，至於其酵母菌量、鹽濃度、pH 值、殘留總糖量、殘留還原糖量、與乙醇濃度另整理於 Fig. 3。

由 Table 2 可得知，10% *S. cerevisiae*

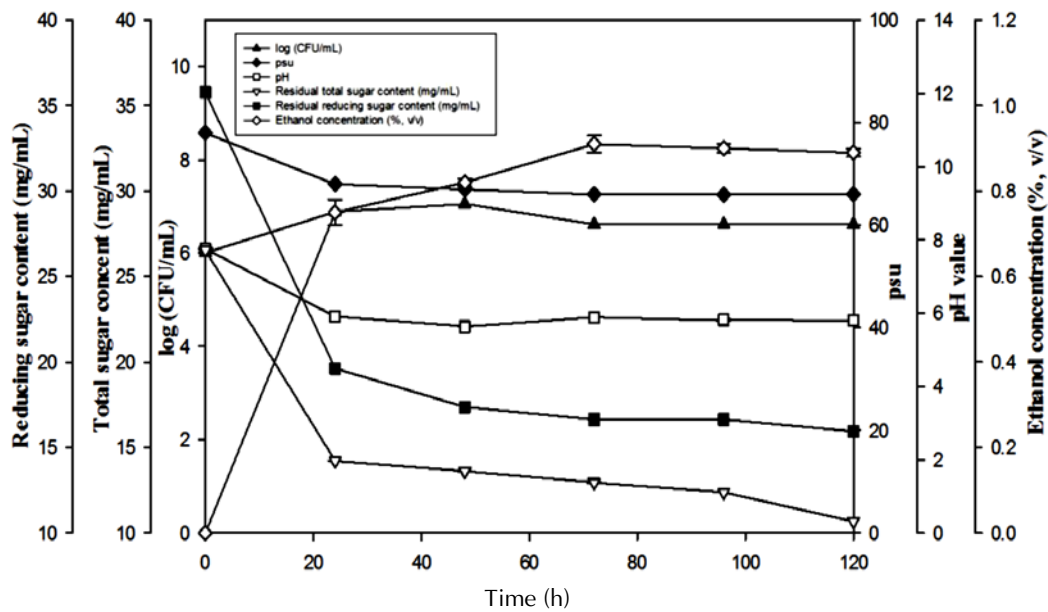


Fig. 3 Yeast count, residual total sugar content, residual reducing sugar content, salinity, pH value, and ethanol concentration results of the *Ulva lactuca* polysaccharides hydrolysate after batch fermentation¹ by *Saccharomyces cerevisiae* BCRC21685 (10%) at room temperature for 120 h². [Batch procedure of ethanol fermentation was conducted at room temperature for 120 h; the working volume of the ethanol fermentation was 100 ml; ²Each value is mean \pm standard deviation (n = 3)].

Table 2 The analyses results for residual total sugar content, residual reducing sugar content, reducing sugar utilized, ethanol concentration, and ethanol yield of the *Ulva lactuca* polysaccharides hydrolysate during batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21685 (10%) at room temperature for 120 h

Reaction time (h) ¹	Residual total sugar content (mg/ml)	Residual reducing sugar content (mg/ml)	Reducing sugar utilized (%)	Ethanol concentration (% v/v)	Ethanol yield (g/100 g) ³
0	26.53 \pm 0.01 ^{2a}	35.76 \pm 0.01 ^a	0.00 \pm 0.00 ^e	0.00 \pm 0.00 ^e	0.00 \pm 0.00 ^f
24	14.16 \pm 0.01 ^b	19.62 \pm 0.01 ^b	45.12 \pm 0.01 ^d	0.75 \pm 0.01 ^d	16.00 \pm 0.01 ^e
48	13.60 \pm 0.01 ^c	17.37 \pm 0.00 ^c	51.42 \pm 0.02 ^c	0.82 \pm 0.02 ^c	17.40 \pm 0.02 ^d
72	12.94 \pm 0.01 ^d	16.63 \pm 0.02 ^d	53.50 \pm 0.01 ^b	0.91 \pm 0.02 ^a	19.34 \pm 0.02 ^a
96	12.38 \pm 0.01 ^e	16.63 \pm 0.00 ^d	53.50 \pm 0.01 ^b	0.90 \pm 0.02 ^a	19.23 \pm 0.02 ^b
120	10.67 \pm 0.01 ^f	15.94 \pm 0.01 ^e	58.12 \pm 0.01 ^a	0.89 \pm 0.01 ^b	19.03 \pm 0.01 ^c

¹Batch fermentation was conducted at room temperature for 24-120 h; the working volume of ethanol fermentation was 100 ml *U. lactuca* polysaccharides hydrolysate.

²Each value is mean \pm standard deviation (n = 3). Different superscript letters in the same column indicate significantly different values ($p < 0.05$).

³Ethanol yield (g/100 g *Ulva* powder) = [ethanol concentration (% v/v) \times total liquid volume (ml) \times density of ethanol (0.8 g/ml)] \div the weight of *U. lactuca* powder \times 100.

BCRC21685 石蓴多醣水解液在室溫避光靜置批次發酵 120 h 後，殘留總糖量為 10.67 ± 0.01 mg/ml、殘留還原糖量為 15.94 ± 0.02 mg/ml、還原糖利用率為 $58.12 \pm 0.01\%$ ，但是以發酵 72 h 時之乙醇濃度與乙醇產率較高分別為 $0.91 \pm 0.02\%$

與 19.34 g/100 g *Ulva* 粉末。

由 Fig. 3 可得知 10% *S. cerevisiae* BCRC21685 於石蓴多醣水解液中，在室溫避光靜置批次發酵 24~120 h 之酵母菌量、鹽度、pH 值，48 h 之酵母菌量為 6.69 ± 0.02 log CFU/ml，但是

Table 3 The analyses results for residual total sugar content, residual reducing sugar content, reducing sugar utilized, ethanol concentration, and ethanol yield of the *Ulva lactuca* polysaccharides hydrolysate during fed-batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21685 (10%) at room temperature for 120 h

Reaction time (h) ¹	Residual total sugar content (mg/ml)	Residual reducing sugar content (mg/ml)	Reducing sugar utilized (%)	Ethanol concentration (% , v/v)	Ethanol yield (g/100 g) ³
0	26.53 ± 0.01 ^{2a}	35.76 ± 0.01 ^a	0.00 ± 0.00 ^e	0.00 ± 0.00 ^f	0.00 ± 0.00 ^f
24	15.62 ± 0.01 ^d	16.95 ± 0.01 ^d	52.67 ± 0.01 ^c	0.85 ± 0.01 ^e	18.02 ± 0.01 ^e
48	15.53 ± 0.01 ^d	16.93 ± 0.00 ^d	52.60 ± 0.02 ^c	0.87 ± 0.02 ^d	18.61 ± 0.02 ^d
72	18.31 ± 0.01 ^b	21.93 ± 0.02 ^c	38.69 ± 0.01 ^d	0.99 ± 0.02 ^c	20.97 ± 0.02 ^c
96	16.17 ± 0.01 ^c	22.64 ± 0.00 ^b	55.85 ± 0.01 ^b	1.00 ± 0.02 ^b	21.33 ± 0.02 ^b
120	13.56 ± 0.01 ^e	15.79 ± 0.01 ^e	58.75 ± 0.01 ^a	1.02 ± 0.01 ^a	21.76 ± 0.01 ^a

¹Fed-batch fermentation was conducted at room temperature for 24-120 h; the initial volume of fermentation was 50 ml; 25 ml *U. lactuca* polysaccharides hydrolysate was added during the fermentation at 72 and 96 h.

²Each value is mean ± standard deviation (n = 3). Different superscript letters in the same column indicate significantly different values ($p < 0.05$).

³Ethanol yield (g/100 g *Ulva* powder) = [ethanol concentration (% , v/v) × total liquid volume (ml) × density of ethanol (0.8 g/ml)] ÷ the weight of *U. lactuca* powder × 100

隨後卻隨著反應時間的增加，酵母菌量隨之減少，發酵至 72 h 時，雖然酵母菌量減少，但是乙醇濃度卻是較高的，因此乙醇產率也較高，但是隨後酵母菌量與乙醇濃度皆減少，推測可能是代謝產物或鹽濃度等多種因素影響了酵母菌生長量。Chen *et al.* (2011) 先以熱水萃取 2 次，後續再以纖維素酶、洋菜酶與 0.4 N HCl 水解。並且以 UF (5 kDa) 處理後之石蓴多醣水解液，以各接種 2.5% *S. cerevisiae* BCRC21686、BCRC21687、與 BCRC22220 於 18°C 下避光發酵 14 天，得到 12.01 g/100 g dry *Ulva*。

在同樣的發酵時間下，Hong *et al.* (2014) 分別使用紅藻 *Gelidium amansii*、褐藻 *Laminaria japonica* 與綠藻 *Codium fragile* 以酸與酵素進行水解，隨後進行發酵生產生質乙醇，在第 3 天時乙醇產率達到最高，分別約為 11 g/100 g dry *Gelidium*、8 g/100 g dry *Laminaria*、與 7 g/100 g dry *Codium*，與本研究相比，石蓴多醣水解液發酵生產生質乙醇之產率較高。

Meinita *et al.* (2015) 分別以 0.2 M HCl 與 0.2 M H₂SO₄ 以 130°C 水解 *G. latifolium* 15 分鐘後進行批次發酵，分別得到 18.20 g/L 與 8.58 g/L 之生質乙醇，產率約為 36.4 g/100 g dry *Gelidium* 與 17.16 g/100 g dry *Gelidium*；Kim *et al.* (2015) 使用 *G. amansii* 分別以 cellulase 與 α -glucosidase

水解並進行批次發酵，最終得到 17.35 g/L 之生質乙醇，產率約為 34.70 g/100 g dry *Gelidium*。因為 *G. amansii* 主要單糖組成以 glucose 與 galactose 為主，利於酵母菌利用生產生質乙醇，而石蓴單糖組成則是以 rhamnose 為主，較不利於酵母菌利用，故乙醇產率相較之下較低。

四、*S. cerevisiae* BCRC21685 (10%) 於石蓴發酵液之石蓴多醣水解液之饋料批次發酵試驗

取 50 ml 石蓴多醣水解液至發酵瓶中，接種 10% (v/v) *S. cerevisiae* BCRC21685 於室溫避光靜置發酵 24~120 h，進行饋料批次發酵，分別於發酵 72 h 與 96 h 各加入 25 ml 石蓴多醣水解液，使最後石蓴多醣水解液之總發酵體積為 100 ml。發酵液之酵母菌量、殘留總糖量、殘留還原糖量、鹽濃度、pH 值、還原糖利用率、乙醇濃度、與乙醇產率整理於 Table 3 與 Fig. 4。由批次發酵實驗結果得知，因為石蓴多醣水解液之鹽濃度為 7.8%，影響酵母菌之生長，並且吳 (2012) 指出提高鹽濃度會降低酵母菌量，故馬尾藻多醣水解液未經濃縮，則是以原液進行饋料，因此推論若將石蓴多醣水解液經過濃縮後，鹽濃度的提高更會降低酵母菌量，進而減少乙醇濃度與乙醇產率，並且考量到

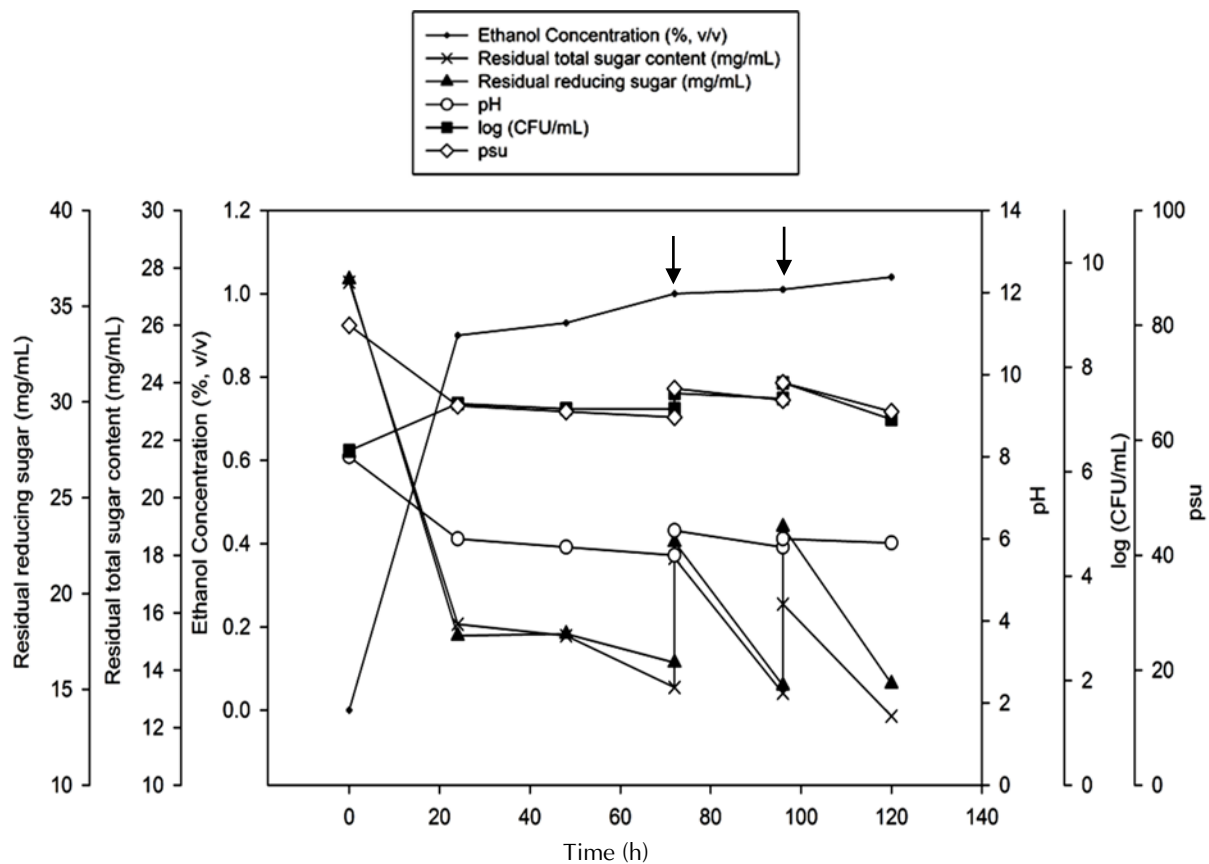


Fig. 4 Yeast count, residual total sugar content, residual reducing sugar content, salinity, pH value, and ethanol concentration results of the *Ulva lactuca* polysaccharides hydrolysate after fed-batch fermentation¹ by *Saccharomyces cerevisiae* BCRC21685 (10%) at room temperature for 120 h². [¹Fed-batch procedure of ethanol fermentation was conducted at room temperature for 120 h; the working volume of the ethanol fermentation was 50 ml; the arrows denote the time points when 25 ml *U. lactuca* polysaccharides hydrolysate was added to the fermentation for 72 and 96 h; ²Each value is mean \pm standard deviation (n = 3)].

使用除鹽設備會增加生產成本，因此選擇以未濃縮之石蓴多醣水解液進行饋料批次發酵。

由 Table 3 可得知 10% *S. cerevisiae* BCRC21685 於石蓴多醣水解液中，在室溫避光靜置饋料批次發酵 120 h 之殘留總糖量為 13.56 ± 0.00 mg/ml、殘留還原糖量為 15.79 ± 0.01 mg/ml、還原糖利用率為 $58.75 \pm 0.00\%$ 、乙醇濃度為 $1.02 \pm 0.01\%$ 、與乙醇產率為 21.76 g/100 g *Ulva* 粉末。

Figure 4 為 10% *S. cerevisiae* BCRC21685 於石蓴多醣水解液中，在室溫避光靜置饋料批次發酵 24 ~ 120 h 之酵母菌量、鹽濃度、pH 值，以 24 h 之酵母菌量較高，為 7.23 ± 0.00 log CFU/ml，但是隨後卻隨著反應時間的增加，酵母菌量隨之減少，發酵至 72 h 進行饋料時，酵母菌量為 7.18

log CFU/ml，發酵至 96 h 進行饋料時，酵母菌量降至 6.62 log CFU/ml，而發酵至 120 h 酵母菌量則增加至 6.67 log CFU/ml。發酵至 72 h 進行饋料時，酵母菌量較高，然而乙醇濃度則明顯增加，但是隨後酵母菌量減少而乙醇濃度卻增加，推測可能是代謝產物或鹽濃度等多種因素影響了酵母菌生長量。發酵至 24 h 之殘留總糖量較低，為 7.23 ± 0.00 log CFU/ml，但是隨後卻隨著反應時間的增加，酵母菌量隨之減少，發酵至 72 h 進行饋料時，酵母菌量從 6.14 ± 0.01 增加到 7.18 log CFU/ml，發酵至 96 h 進行饋料時，酵母菌量從 6.16 ± 0.01 增加到 6.62 log CFU/ml，而發酵至 120 h 酵母菌量則增加 6.67 log CFU/ml。隨著反應時間之增加，殘留總糖量與殘留還原糖量隨之減少，但是還原糖利用率、乙醇濃度、與乙醇產率

卻隨之增加。本研究之饋料批次發酵之乙醇產率確實較批次發酵之乙醇產率高，因此饋料批次發酵亦提高了石蓴生質乙醇之產率。Liu *et al.* (2010) 以酸去除木質纖維素再以鹼中和之玉米桿進行批次發酵與饋料批次發酵，分別得到 53.2 g/L 乙醇產量與 57.6 g/L 乙醇產量，顯示饋料批次發酵之乙醇產率較批次發酵之乙醇產率高。吳 (2012) 以製程 K 水解馬尾藻後進行批次發酵與饋料批次發酵，分別得到 25.48 g/100 g dry *Sargassum* 與 26.67 g/100 g dry *Sargassum* 乙醇產率。李等 (2012) 以石花菜多醣水解液進行饋料批次發酵，石花菜多醣水解液濃度為 12.17 mg/ml，隨後以濃縮石花菜多醣水解液饋料於 24、48、68、與 96 h，使饋料還原糖濃度達 12.13、17.43、25.51、與 40.74 mg/ml，發酵至 120 h 後，消耗 42.137 g 還原糖，乙醇濃度達 3.256%，可自 148 g 乾燥石花菜產生 32.56 g 生質乙醇。因此可知以濃縮的藻類多醣水解液進行饋料，增加還原糖量即可增加乙醇產率，所以本研究若能提升還原糖量，以及繼續增強酵母菌對於石蓴多醣水解液中簡單醣類之利用效率，則仍可持續增高石蓴生質乙醇之產率。由上述多組研究結果顯示饋料批次發酵可進一步提升自石蓴產製生質乙醇之產率，對於未來拓展海洋生質燃料之發展深具潛力。

謝 辭

本研究承蒙經濟部學界開發產業技術計畫(臺灣藻類產業應用技術開發 3 年計畫) 101-EC-17-A-17-S1-210) 之經費支持，特致謝忱。

參考文獻

- 吳奕霏 (2012) 馬尾藻生質乙醇之最適生產條件探討。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士論文，基隆，臺灣。
- 李樵，蘇明璉，陳建志，黃美瑩，蕭心怡，潘崇良 (2012) 石花菜熱萃多醣水解液以饋料批次發酵產製生質乙醇之初期探討。臺灣水產學會學術論文發表會，2013 年 1 月 19 日，基隆，APN-09。
- 林佑生，李文乾 (2009) 生質能源-生質乙醇。科學發展，443: 20-25。

- 楊依珊 (2011) *Pseudomonas vesicularis* MA103 所產 Alginate lyase 之基因轉殖至 *Lactococcus lactis* NZ3900 表現及 Alginate lyase 所產寡醣產物分析和用於酵母菌發酵生產乙醇之探討。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士論文，基隆，臺灣。
- Adams, J. M., J. A. Gallagher and I. S. Donnison (2009) Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *J. Appl. Phycol.*, 21: 569-574.
- Bae, Y. J., C. Ryu, J. K. Jeon, J. Park, D. J. Suh, Y. W. Suh, D. Chang and Y. K. Park (2011) The characteristics of bio-oil produced from the pyrolysis of three marine macroalgae. *Bioresour. Technol.*, 102: 3512-3520.
- Bauer, S., P. Vasu, A. J. Mort and C. R. Somerville (2005) Cloning, expression, and characterization of an oligoxyloglucan reducing end-specific xyloglucanobiohydrolase from *Aspergillus nidulans*. *Carbohydr. Res.*, 340: 2590-2597.
- Chen, P. H., Y. P. Wu, F. H. Hu, M. T. Su, W. S. Liang, H. J. Tsai and C. L. Pan (2011) The study of fermenting *Ulva lactuca* to renewable bioethanol. *In* 1st International Conference on Algal Biomass, Biofuel and Bioproducts. St Louis, MO, U.S.A., pp. 3, 35.
- Disumkes, G. C., D. Carrieri, N. Bennette, G. M. Ananyev and M. C. Posewitz (2008) Aquatic phototrophs: Efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotech.*, 19: 235-240.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- Hong, I. K., H. Jeon and S. B. Lee (2014) Comparison of red, brown and green seaweeds on enzymatic saccharification process. *J. Ind. Eng. Chem.*, 20: 2687-2697.
- John, R. P., G. S. Anisha, K. M. Nampoothiri and A. Pandey (2011) Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.*, 102: 186-193.
- Khambhaty, Y., K. Mody, M. R. Gandhi, S. Thampy, P. Maiti, H. Brahmhatt, K. Eswaran and P. K. Ghosh (2011) *Kappaphycus alvarezii* as a source of bioethanol. *Bioresour. Technol.*, 3: 1-6.
- Khambhaty, Y., K. Mody, M. R. Gandhi, S. Thampy, P. Maiti, H. Brahmhatt, K. Eswaran and P. K. Ghosh (2012) *Kappaphycus alvarezii* as a source of bioethanol. *Bioresour. Technol.*, 103: 180-185.
- Kim, H. M., S. G. Wi, S. Jun and H. J. Bae (2015) Efficient approach for bioethanol production from red

- seaweed *Gelidium amansii*. *Bioresour. Technol.*, 175: 128-134.
- Lahaye, M. and A. Robic (2007) Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8: 1765-1174.
- Lee, S. M. and J. H. Lee (2011) The isolation and characterization of simultaneous saccharification and fermentation microorganisms for *Laminaria japonica* utilization. *Bioresour. Technol.*, 102: 5962-5967.
- Liu, K., X. Lin, J. Yue, X. Li, X. Fang, M. Zhu, J. Lin, Y. Qu and L. Xiao (2010) High concentration ethanol production from corn cob residues by fed-batch strategy. *Bioresour. Technol.*, 101: 4952-4958.
- Mandels, M. and E. T. Reese (1957) Induction of cellulose in *Trichoderma viride* influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.*, 73: 269-287.
- Meinita, M. D. N., B. Marhaeni, W. Tjahjo., D. Setyaningsih and Y. K. Hong (2015) Catalytic efficiency of sulfuric and hydrochloric acids for the hydrolysis of *Gelidium latifolium* (Gelidiales, Rhodophyta) in bioethanol production. *J. Ind. Eng. Chem.*, 27: 108-114.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
- Mota, R., R. Guimarães, Z. Büttel, F. Rossi, G. Colica, C. J. Silva, C. Santos, L. Gales, A. Zille, R. de Philippis, S. B. Pereira and P. Tamagnini (2013) Production and characterization of extracellular carbohydrate polymer from *Cyanothece* sp. CCY 0110. *Carbohydr. Polym.*, 92: 1408-1415.
- Ortiz, J., N. Romero, P. Robert, J. Araya, J. Lopez-Hernandez, C. Bozzo, E. Navarrete, A. Osorio and A. Rios (2006) Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food. Chem.*, 99: 98-104.
- Percival, E. (1979) The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. *Br. Phycol. J.*, 14: 103-117.
- Rose, A. H. (1977) Scientific basis of alcoholic beverage production. *Econom. Microbiol.*, 1: 10-40.
- Sathivel, A., H. R. Raghavendran, P. Srinivasan and T. Devaki (2008) Anti-peroxidative and anti-hyperlipidemic nature of *Ulva lactuca* crude polysaccharide on D-galactosamine induced hepatitis in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 3262-3267.
- Wang, M. L., J. T. Wang and Y. M. Choong (2004) Simultaneous quantification of methanol and ethanol in alcoholic beverage using a rapid gas chromatographic method coupling with dual internal standards. *Food Chem.*, 86: 609-615.
- Wu, S.C. and C. L. Pan (2004) Preparation of algal-oligosaccharide mixtures by bacterial agarases and their antioxidative properties. *Fish. Sci.*, 70(6): 1164-1173.

Study on the Production Conditions of Bioethanol from *Ulva lactuca* by Batch and Fed-Batch Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*

Mei-Ying Huang¹, Chiao Lee^{2,3}, Chin-Yueh Lai² and Chorng-Liang Pan^{2,3*}

¹Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

²Department of Food Science, National Taiwan Ocean University

³Taiwan Algae Research Center, National Taiwan Ocean University

ABSTRACT

The present study investigated the production conditions of bioethanol fermented from the enzymatically hydrolyzed polysaccharides (PS) of *Ulva lactuca*. *U. lactuca* powder (5%, w/v) was sequentially treated with 0.4 N HCl at 121°C for 20 min, cellulase hydrolysis, α -amylase hydrolysis, and MA103/MAEF108 crude enzymes hydrolysis. The total sugar content, reducing sugar content, and NaCl content of the *U. lactuca* PS hydrolysate were 7.39 mg/ml, 8.40 mg/ml, and 5.0%, respectively. After *U. lactuca* PS hydrolysate was fermented with 10% *S. cerevisiae* BCRC21685 at room temperature for 72 h, the ethanol concentration, ethanol yield, and reducing sugar utilization of the fermentation solution reached 0.91%, 19.34 g/100 g *Ulva* powder, and 53.5%, respectively. When the *U. lactuca* PS hydrolysate was fed-batch fermented with 10% *S. cerevisiae* BCRC21685 at room temperature for 120 h, the ethanol concentration, ethanol yield, and reducing sugar utilization of the fermentation solution reached 1.02%, 21.76 g/100 g *Ulva* powder, and 58.74%, respectively. Fed-batch fermentation can further enhance the bioethanol production from *Ulva lactuca* fermentation with *S. cerevisiae*.

Key words: *Ulva lactuca*, enzymatic hydrolysis, batch fermentation, fed-batch fermentation, yeast, bioethanol

*Correspondence: Department of Food Science, National Taiwan Ocean University, No. 2, Pei-Ning Rd, Keelung, Taiwan 20224. TEL: (02)2462-2192; E-mail: b0037@ntou.edu.tw