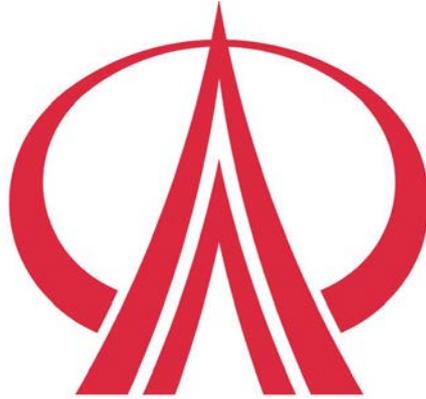


能源與材料科技系 實務專題論文

稻稈纖維水解方式之比較



指導老師： 林孫基

班級	學號	姓名
能材三乙	BB101075	劉宗顯
能材三乙	BB101079	許少頤
能材三乙	BB101086	許家彰
能材三乙	BB101088	蔡宗羽
能材三乙	BB101089	曾家倫

修 平 科 技 大 學

中 華 民 國 一 〇 四 年 五 月 二 十 五 日

誌謝（致謝）

感謝指導老師林孫基教授細心的指導，與幫助我們指引實驗上遇到的困難，順利的製作出本次的專題報告，雖然我們經驗不夠，不熟悉專題的方向與撰寫的技巧，還好有遇到學長劉俊敏的幫助，讓我們能更快找到實驗的方向、專題的製作，也謝謝本組組員的努力，雖然大家都要上班，但還是利用空閒時間，努力做出實驗，製作的過程中雖然幾經許多小插曲與困難，但還是順利的完成並測得實驗數據，每一個步驟與程序，每個組員都能共同討論與設法解決遇到的困難，就是很好的回憶，在一點一滴深入完成此項實驗時，也能更理解實驗的原理與團隊合作的精神，我們也如同與這份專題一起成長，老師能針對我們的缺點，給予指正以及建議，實在是十分感謝，雖然我們有做不好的地方，但改正後，雖然要重新做那一部分，但也令我們更熟悉更能上手此步驟，也從中學習到做事必須要更嚴謹的態度，事前準備工作以及內容要先充分理解才不會做的時候手忙腳亂，總而言之，感謝大家的幫忙，感謝各位組員的付出讓我們的專題報告能順利的完成。

摘要 (Abstract)

目前地球正面臨了能源危機，但與過去能源危機不同的點是，這次將是長期而持續的危機。主要發生問題的原因，首先是人口的急遽增加，人類的需求膨脹，以及「城市」和「工業」發展所造成的汙染。隨著人類經濟活動不斷發展，人類的生活變得更加便利也更加進步。但在進步的同時，能源正急遽的減少也危害到我們的所居住的環境。因此，開發可代替的再生能源和減少溫室氣體的排放便成為重要的議題。

纖維素生質能(Cellulosic biomass)是一個可更新且全球需求量非常大的替代的能源，乙醇是一種可以從纖維素生質能大量產生的替代能源。因此，可以預期未來可以從像纖維素廢棄物的低成本發酵生產生質酒精供應非再生石化燃料的不足。稻米為台灣主要農作物，稻米收割後，廢棄的稻稈往往為農產廢棄物或焚燒式作為堆肥之用，本實驗是抱持資源再利用之想法，嘗試以稻稈纖維中取出葡萄糖，利用化學法與物理法進行纖維素水解比較，探討預處理方法對纖維素分解之影響。

實驗結果顯示：

稀酸水解法：

硫酸 1M 濃度下、時間3 hr、稻稈濃度 20 g/L 時，最佳產率為5.805%。

酵素水解法：

在 pH 6、時間 144 hr、稻稈濃度 5 g/L，最佳產率為2.46%。

目錄

誌謝 (致謝)	2
摘要 (Abstract)	3
圖目錄	5
表目錄	6
第一章 緒論 (Introduction)	7
前言	7
研究動機與目的	10
第二章 文獻探討 (Literature Survey)	11
纖維素水解發展	11
纖維素水解	14
第三章 研究方法 (Methodology)	21
實驗藥品與分析儀器	21
實驗藥品配置	22
實驗步驟	23
第四章 結果與討論 (Results and discussion)	25
第五章 結論 (Conclusions)	33
參考文獻 (References)	34
附錄	39
附錄一 高壓滅菌釜操作方法(濕熱法)	39
附錄二 分光光度計原理操作說明	40
附錄三 抽氣過濾器操作方法	41
附錄四 葡萄糖檢量線	42

圖目錄

圖 1-1	纖維素水解流程	9
圖 2-1	(A)纖維素化學結構式	13
圖 2-2	(B)纖維素纖維結晶結構	13
圖 2-3	酸水解流程	17
圖 4-1	硫酸濃度對水解效率的影響	25
圖 4-2	木質素對稻稈水解的比較	26
圖 4-3	水解時間及產率的影響	27
圖 4-4	pH 值對纖維素水解效率的影響	28
圖 4-5	pH 值對纖維素水解效率的影響	29
圖 4-6	pH 值對纖維素水解效率的影響	30
圖 4-7	pH 值對纖維素水解效率的影響	31
圖 4-8	時間對纖維素水解的影響	32
圖 5-1	葡萄糖檢量線.....	39

表目錄

4.1	硫酸濃度對水解效率的影響	25
4.2	木質素對稻稈水解的影響	26
4.3	水解時間及產率的影響	27
4.4	pH 值對纖維素水解效率的影響 (24 hr).....	28
4.5	pH 值對纖維素水解效率的影響 (48 hr).....	29
4.6	pH 值對纖維素水解效率的影響 (72 hr).....	30
4.7	pH 值對纖維素水解效率的影響 (144 hr).....	31
4.8	時間對纖維素水解的影響.....	31

第一章 緒論 (Introduction)

1.1 前言

目前地球正面臨了能源危機，但與過去能源危機不同的點是，這次將是長期而持續的危機。主要發生問題的原因，首先是人口的急遽增加，人類的需求膨脹，以及「城市」和「工業」發展所造成的汙染。隨著人類經濟活動不斷發展，人類的生活變得更加便利也更加進步。但在進步的同時，能源正急遽的減少也危害到我們的所居住的環境。近年來，由於一些新興國家的經濟崛起化石燃料的消耗量更大幅的提升，其中國際油價更是從 2009 年的 43.06 美金/桶飆漲至現在的 111.94 美金/桶(經濟能源局，2012)。此外，大量地用化石燃料不僅加速能源的枯竭且排放的溫室氣體更是導致全球氣候異常的主因。因此，開發可代替的再生能源和減少溫室氣體的排放便成為重要的議題。

環境汙染所造成的氣候異常導致近年來全球各地天災頻傳，引發世界各國對環保與替代能源的重視，人們開始紛紛研發替代的能源，而生物產氫也是一種新的綠色能源。不但可以解決目前石油短缺的危機，也可以減緩汽機車廢氣的排放，改善地球暖化的議題，所以要發展替代能源。目前生質能為全球第四大能源，僅次於石油、煤及天然氣，供應全球 10.4% 的初級能源需求，也提供了開發中國家約 35% 的能源，為目前最廣泛使用的一種再生能源，約佔世界所有再生能源應用的 80%，與其他再生能源比較，生質能具有優勢包括技術較成熟有商業化運轉能力，經濟效益較高。

因此，能源與環境問題是一體兩面，不能顧此失彼，目前全球學者都以環境保護為前提，進行資源的研究與開發，冀望能找到一種不會造成環境汙染的乾淨能源。

由於溫室效應造成的氣候問題，已受到各國的重視，在全球各國努力尋找新能源的同時，國際間也針對此問題提出「氣候變化綱要公約」及「京都議定書」，以規範溫室氣體排放，並呼籲各國政府制定相關政策，減少能源的浪費。

能源對人類的文明發展扮演非常重要的角色，在食、衣、住、行、及育樂等，都與能源息息相關，人類已經習慣能源帶來的便利，能源的需求只會增加不會減少，然而化石能源有限；以及化石能源所造成的環境問題相當嚴重。因此，全世界研究學者都在積極尋找不會造成汙染且易取得的替代能源。再生能源為地球上大自然的能量轉換過後的能源，由於可再生利用且不會造成汙染，所以再生能源為的地球學者研究的重點。

台灣目前已將生質柴油與生質酒精視為綠色產業之一，於民國2005年6月召開之「第二次全國能源會議」決議推廣生質燃料發展利用。在酒精汽油方面，預定2010年目標100-300萬公秉、2015年200-600萬公秉、2020年300-900萬公秉；生質柴油方面，則預定2010年目標10萬公秉、2020年15萬公秉。此外，為因應全球發展生質燃料趨勢，經濟部亦擬定「推動生質燃料發展計畫」，規劃2008年起強制市售柴油添加1%生質柴油(B1)，2011年起強制加油站供給E3汽油(汽油中添加3%生質酒精)。生質燃料利用在台灣尚屬起步階段，欲達成規劃目標，可考量參照國外推動策略，重新檢視我國推動生質燃料之發展政策。本文旨在探討我國生質柴油與生質酒精之發展現況、推動計畫及未來推廣目標2規劃，並參酌國際發展生質燃料之政策作為，對我國發展生質燃料之相關措施進行探討，以供未來發展生質燃料之參考。

生質能發展至今，技術純熟，且使用基質來源為廢棄物，可以達到廢棄物回收再利用及能源生產，對於全球環境與能源的重視，因此生質能倍受重視。

木質纖維素為自然界含量最豐富且可再生的物質，可以換為糖類作為基質來源。此外，處理含有大量纖維素物質的廢棄物也會造成地球的負擔，如焚燒、焚化等，皆會產生大量硫化物、碳化物。因此使用纖維素生質體為來源，生產糖類製造能源已被重視。纖維素利用技術，是將纖維素物質經物理、化學或酵素水解，使其成為易發酵之原料，進而應用於生質物能源或其他有價值的發酵產品的生產。

近年來，纖維素的水解技術移植都是許多專家學者的研究重點，水解技術主要包括物理法、化學法與酵素法等方法。纖維素水解流程如圖 1-1 所示。

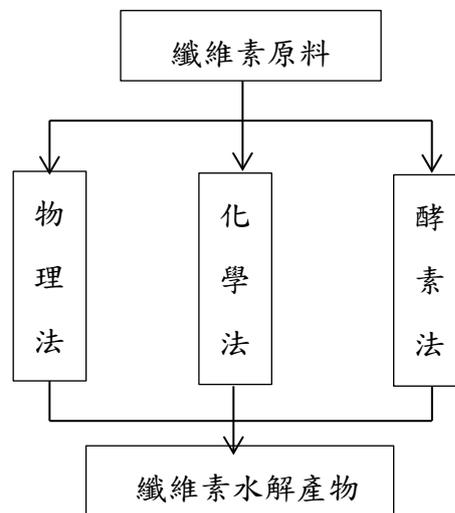


圖 1-1 纖維素水解流程

其中以化學方法進行纖維素水解，速度會比酵素水解還快，且成本研究中可將水解過後之所有產物，用至生物產氫及二氧化碳捕捉中，有零炭排放之優點。

1.2 研究動機與目的

近年來能源危機與環境汙染等問題日漸嚴重，促使綠色意識崛起，綠色能源開始蓬勃發展。因此各國皆致力於研發可再生綠色能源。大量使用化石燃料會造成溫室效應與氣候變遷，對於人類文明發展以及有很大的影響。因此，全世界各國都積極開發新能源，以代替目前人類所依賴的化石能源。其中生質能因其原料來自大自然，且能循環再利用，故成為最受矚目的替代能源之一。生質能原料主要是纖維素，纖維素為地球最豐富的有機物質，植物經過光合作用，每年約有276.25萬噸的纖維素物質。此外，農業、食品加工業所產生的廢棄物以及木材廢棄物也都是纖維素的重要來源。若能加以利用，有效的將纖維素水解，轉化成容易發酵的醱類，當作原料進行發酵作用生成各種能源資源，不僅可以降低成本，減少農業廢棄物，更可以降低石油燃燒造成的環境汙染，並減緩化石能源短缺所造成的能源危機。

水稻為台灣第一大宗作物台灣每年約有 300 萬公噸的廢棄稻稈及稻殼。(稻穀約130多萬噸)收割後的作物殘渣處理為首要解決的問題之一。如能將稻稈及稻殼以不同方式再利用，將可為農業廢棄物另覓一條出路。利用廢棄稻稈纖維素來進行酸水解處理，而後進行發酵蒸餾成乙醇，既能節能減碳又可利用廢棄物。研究目的為使用不同的酸濃度來進行酸水解比較，並以不同的酵素來比較發酵程度，從而得知最適當的水解條件。

第二章 文獻探討 (Literature Survey)

2.1 纖維素水解發展

2.1.1 木質纖維物質

植物細胞壁主要成分為木質纖維素所組成，是地球最豐富之物質，存在於植物界，農業及林業廢棄物等植物體。植物含有自然界中最豐富的碳源，而植物的細胞壁可分為兩種：初生細胞壁(primary walls)合次生細胞壁(secondary walls)。初生細胞壁為植物體行細胞壁合成作用時最先合成；初生細胞壁生長之合成及分解作用下，逐漸生成含有木質素成分之次生細胞壁。而木本植物的木質部細胞會藉由木質素的堆積，使次生細胞壁更加堅固和厚實(Cosgrove, 1998)。

植物的細胞壁主要由纖維素(cellulose)、半纖維(hemicellulose)和木質素(lignin)所構成，以木材來說，這三種主要的成分，分別為纖維素佔了35至50%，半纖維素佔了20至30%(Subramaniyan and Prema,2002)，而木質素則佔了20至30%。隨著不同的植物，其中的比例就隨之不同，像草本類植物的纖維素和半纖維素等物質比例就會跟木本植物有所差異(Sun and Cheng,2002)。

自然界中有很多物質都富含纖維素，例如麥稈、廢紙及棉花。而木質素將纖維素及半纖維素緊緊包覆，使得木質纖維素結構更為堅固，因此，要將纖維素加以利用，必須先將木質素破壞或移除，才能有更好的纖維素水解效果(Mosier,et al.,2005)。

纖維素

在地球上許多生物中，如：蕨類、藻類、木本及草本植物等的細胞壁中都含有纖維素，可以說是最豐富的天然資源，也是自然界最多

的碳水化合物，因此在碳循環中，纖維素為一個重要的腳色(Doi and Kosugi,2004)。如果將纖維素分解後的醣類轉化成氫氣、乙醇以及有機酸等有附加價值的有機物，便可提高纖維素應用於生質能的地位。纖維素是由100~14,000個葡萄糖(D-glucose)單體藉由 β -1,4鍵結方式組成的聚合物(Beguin and Lemaire,1996)，其分子量範圍為200,000~2,000,000之間。

如圖2-1A所示，葡萄糖分子鏈之間的鍵結，是由一個葡萄糖分子上一號碳，連接另一個葡萄糖分子的第四號碳形成直鏈狀聚合物，但構成纖維素不單只是簡單的鏈狀結構，纖維素分子內以氫鍵及凡得瓦力互相鍵結形成微纖維(microfibrils)且以平行方式排列，直徑約為5~12nm，約有50~60個纖維素分子。木質纖維素是由纖維素、半纖維素與木質素所組成的天然高分子複合體，經由處理後可提取其中的糖分(羅翊璋, 2009)。而這個自行聚合的現象，大概是由30個葡萄糖單體聚集而成為初級細纖維(elementary fibril)，接著再由初級細纖維聚集成為微細纖維，最後便由微細纖維聚集而成為一般所知的纖維素(戴上凱,2004)。如圖2-1B所示，纖維長鏈間氫鍵形成的差異可將纖維素區分成為非結晶區(amorphous domain)及結晶型區(crystalline domain)(Goldstein,1983)。非結晶區是指在纖維長鏈在結合時，氫間接合的不好，所形成的空洞狀區域；結晶區是指纖維長鏈排列整齊，彼此密合的很緊，由氫鍵互相連結成四方體，形成一段長且穩定的區域。一般纖維素的聚合度(degree of polymerization,DP)約為3,500-10,000單位分子，纖維素的結晶區具有較強的抗化學藥品性。且這樣的結構，通常並不為一般動物所能消化吸收，必須將它們分解成單糖才能被利用(Cosgrove, 1998)。

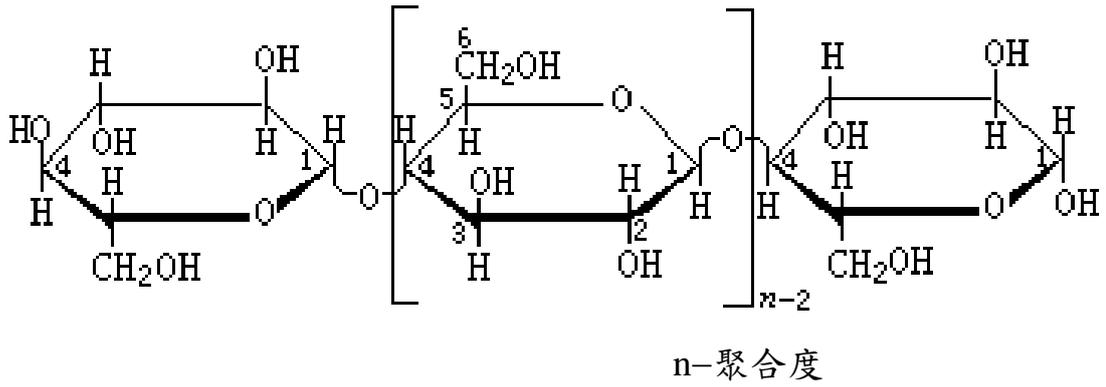


圖 2-1(A)纖維素化學結構式

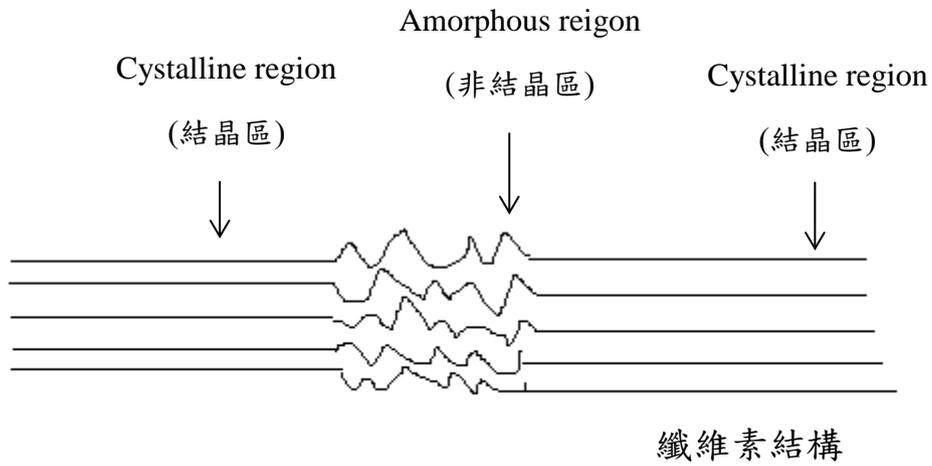


圖 2-2(B)纖維素纖維結晶結構
(Cosgrove, 1998)

半纖維素

半纖維素存在於細胞壁の木質素與纖維素之間，有填充纖維素與木質素間隙的作用。半纖維素之分子式表示為 $(C_6H_{10}O_5)_n$ 或 $(C_5H_8O_4)_n$ ，所以又稱聚戊糖(pentosan)和聚己糖(hexosans)。半纖維素是一種不屬於纖維素的多醣體(Woodward,1984)，是由二種以上不同單醣組成的無結晶型纖維物質，即為一種混合性多醣類，其成分包含五碳糖(pentoses)、木糖(xylose)、阿拉伯糖(arabinose)、葡萄糖(glucose)、甘露糖(mannose)、半乳糖(galactose)及甲基葡萄糖醛酸(methylglucuronic acid)等(Mosier,et al., 2005)。屬於一種不溶於水的多醣，但可藉由稀酸或稀鹼溶液自植物中萃取出(Ahmed et al., 2001)。

木質素

木質素是由苯丙烷單體結構所組成的立體網狀結構高分子，含碳量高，在細胞壁中扮演固定作用的角色，連接纖維素和半纖維素，並不能水解成為單醣，木質素的存在會阻礙纖維素的水解(Mosier,et al., 2005)；無果能將纖維素原物料經過預處理，破壞其纖維素結晶度，即能提高水解效率。

2.1.2纖維素水解

在地球上，所有植物皆含有纖維素、木質素和半纖維素，等三種成分。具有結晶型的纖維素、半纖維素與木質素共存，形成一強建構性結構，由於纖維素本身含有高度結晶及木質素所造成的物理屏障，如果沒有使用一些特別的方法處理，使木質纖維素變得比較敏感，而直接使用細菌或黴菌的纖維素分解酵素來分解木質纖維素，分解效果通常不到20%(Knappert et al., 1980)。

一般的物理與化學處理法主要是要移除掉半纖維素或木質素，使木質纖維素的結構產生孔洞，而讓生物性酵素較容易浸入纖維素，進

而分解纖維素(Converse et al., 1989)。半纖維素及木質素的除去會使纖維素纖維分解酵素更加容易表現。例如：將半纖維素的移除，會使酵素分解纖維素的產量超過90%(Grohmann et al., 1985)。如果移掉木質素，則酵素分解的產量和速率都將會比移除掉半纖維素來的更快。木質纖維素處理方法有分成物理性質、化學性質和生物物質。物理性質的處理是利用輻射和粉碎的方式；其缺點是太慢、太耗能量和太花錢了。此外也可藉由蒸氣加熱來分解半纖維素中的自然酸類，但根據報導來自半纖維素所產生的糖，理論上會降到65%以下(Heitz et al., 1991；Ramos et al., 1992)。用熱水浴來做再生性生物資源的預先處理，這種方法會比用蒸氣的方法來的好，但只能得到低濃度的糖。生物性的方法是利用細菌等微生物來做事前處理，因為微生物除了會分解木質素以外，也會分解纖維素和半纖維素，是相當簡單的方法而且能量消耗也相當低，但是缺點是速度較慢。而利用纖維分解酵素來分解再生性生物資源，成本相當昂貴，所以不適合利用。

物理法

目前常用的方法包括研磨法、蒸氣爆破法、微波和超音波處理法等，這些方法都能改變纖維素結構。

研磨法：主要是利用機械粉碎，使生質原料的顆粒變小，增加和酶的接觸表面積，更重要的是破壞纖維素的晶體結構，可以提高水解效率(李穩宏等, 1997)，但是粉碎生質原料所需耗能較大。

蒸氣爆破法：先將纖維素原料用高溫水蒸氣外處理適當時間，然後連同水蒸氣一起從反應釜中急速放出而爆破分解。蒸氣爆破耗能很低，不用考慮環保這些成本費用。已成為最廣泛的爆破技術。蒸氣爆破影響因素以溫度、停留時間、原料顆粒大小及濕度，有研究結果表示低溫和長的停留時間有助提高爆破效率。在爆破過程中加速適量的酸或酸性氧化物，更能去除半纖維素，減少對隨後反映有抑制的化合物。有效提高酶水解效率(Carniti,1992)。

氨爆破法：利用液態氨相對較低的壓力約<1.5MPa>和溫度<約 50~80

°C>將原料處理一段時間，然後突然釋放壓力來爆破分解，過程中液態氨迅速汽化而產生聚冷作用，不僅有助於纖維素表面積的增加，而且還可以避免高溫條件下的醣類物質變質。液態氨可回收利用，成本低該方法是很有前景的預處理技術之一。木質纖維原料產生燃料乙醇主要分兩步：纖維素水解成糖，糖發酵成醇。現今從糖發酵轉化成醇的過程是簡單和成熟的，所以糖化過程是木質纖維素制備燃料乙醇的關鍵，主要包括酸解、酶解方法。

微波法：經微波處理後，可使纖維素分子間氫鍵發生變化(雄健等, 2000)。

超音波法：經過處理後，纖維素結構發生型變，使得細胞壁上的細胞發生裂痕，稱細胞壁位移，進而促進水解作用(唐愛民、梁文芷, 2000)。

化學法

一般纖維素水解的化學法是利用稀酸水解和濃硫酸水解。酸水解分解途徑，首先酸液接觸纖維素後釋放出 $[H^+]$ ，而 $[H^+]$ 打破纖維素中的糖苷鍵，水解生成葡萄糖和低聚糖，葡萄糖可再進一步分解成更小分子的化合物五羧甲基糠醛，再經過脫羧後，會生成甲酸(庄新姝, 2006)。水解流程如圖2-3所示

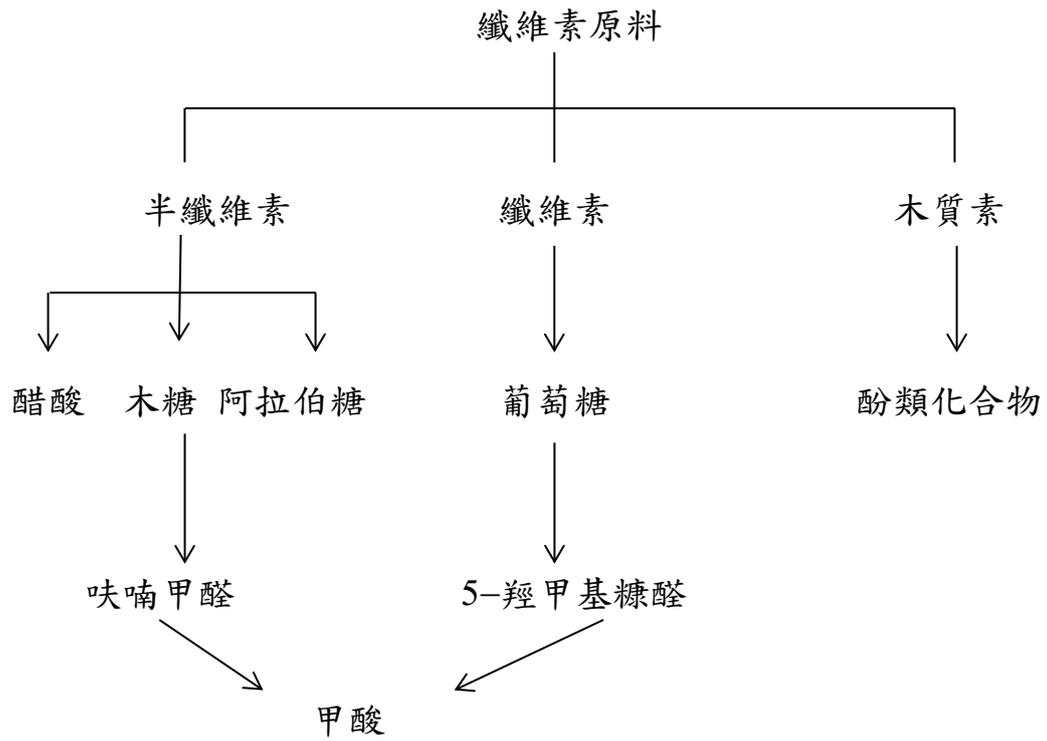


圖 2-3 酸水解流程

酸解:

酸水解纖維素類物質早在19世紀末就有研究，但是到現在進展不大。酸水解分為(1)稀酸水解(2)濃酸水解，可以在較溫和的條件下進行。但酸解會伴隨出一些有毒產物如乳化醛、酚等物質危害環境。稀酸水解可以將纖維素轉化成單元糖，但是稀酸水解糖的轉化率只能達到50%，因為其水解過程產生的化合物是大多數微生物的抑制劑。濃酸水解大約有90%的纖維素合辦纖維素轉化糖被回收，但濃酸水解的酸難以回收，還要要求有耐腐蝕耐酸的大容積反應器，造成增多許多成本。

稀酸水解:

稀酸水是指用10%以內的硫酸或鹽酸等無機酸微催化劑將纖維素、半纖維素水解成單糖的方法。在纖維素的稀酸水解中，水中的氫離子可和纖維素上的氧原子相結合，使其變得不穩定，容易和水反應，使纖維素長鏈在該處斷裂，同時又放出氫離子但是所得的葡萄糖還是會進一步反應，生成降解產物。

水解方法:(1)兩步水解法(2)極低濃度酸水解法(3)高溫熱水法(4)超臨界水解法。

影響因素:

- (1) 固液比:指所用的水解液體積和固體原料質量比，所以固液比爭家單位原料的醣產量增加，但水解成本上升。
- (2) 原料粉碎度:接觸面積越大，水解效果越好。
- (3) 反應溫度:升高溫度可提升水解速率，每升高10°C水解速度快0.5~1倍左右，但高溫也會加快葡萄糖分解速度，所以水解溫度越高，反應時間不能過長。
- (4) 水解時間:實驗證明，水解時間有一定的最大數值，超過一定數值，水解速率會降低也容易導致單醣水解的量增加。
- (5) 酸濃度:酸濃度對於水解有一定的極好數值，在此範圍左右，纖維素水解的速率最好，假如偏離該數值，則影響速率。

濃酸水解：

濃酸水解指濃度在41%~42%的鹽酸、65%~72%的硫酸或80%~85%的硝酸中將生物質水解成單糖的方法。結晶纖維素在較低的溫度下可完全溶解於72%的硫酸或42%的鹽酸中，轉化成含幾個葡萄糖單元的低聚醣(主要纖維四醣)。把溶液加水稀釋並加熱，經一定時間後就可以把纖維四醣水解成葡萄糖產率更高。優缺點：(1)醣的回收率高，最高可達90%以上(2)所需時間長(3)所以酸必須要回收(4)對設備的腐蝕嚴重、環境污染大。

酵素法

酵素水解纖維是由纖維分解酶(cellulose enzymes)所作用的反應，產物為還原糖。由於是生物分解作用，因此反應條件較為溫和，不需酸製之抗壓設備，投資成本較低，且無腐蝕之顧慮。纖維素分解酵素是一群水解酵素(hydrolase)組成，依催化作用活性方式及結構特性可分為三類(Lynd et al.,2002):

內切型纖維素分解酵素(Endo-1,4- β -D-glucanase):此酵素在纖維素的無定型區域多醣鏈上隨機作用，產生許多不同長度的低聚醣類(Oligosaccharides)逐漸增加了還原糖的濃度(Beguin et al., 1994;Lynd et al., 2002；Wood et al.,1988)。

外切型纖維素分解酵素(Exo-1,4- β -D-glucanase):此類酵素主要作用於纖維素結晶型部分，如微結晶型(microcrystal)的棉花。它可自纖維素末端起，以纖維雙醣(cellobiose)為單位將之水解。

β -葡萄糖苷酵素(β -1,4-D-glucanase):可將纖維雙醣(cellobiose)或纖維寡醣(cellooligosaccharide, DP=3~4)自非還原端起，以葡萄糖一個單位予以水解(Bhat et al., 1997)。由於能將先為雙醣分解成葡萄糖，可以減少纖維雙醣對於內切型纖維素分解酵素(endo- β ,1-4-D-glucanase)以及外切型纖維素分解酵素(exo- β ,1-4-D-glucanase)活性的抑制作用，但是 β -葡萄糖苷酵素(β ,1-4-D-glucanase)本身的活性則會受到葡萄糖累積的抑制(Bisaria eta al., 1981)。

第三章 研究方法 (Methodology)

3.1 實驗藥品與分析儀器

3.1.1 實驗藥品

氫氧化鈉 Sodium hydroxide

稻稈粉末 (竹塘鄉竹塘村)

硫酸 Sulfuric acid

葡萄糖 Glucose

二硝基水楊酸 Dinitrosalicylic acid

酒石酸鉀鈉 Potassium Sodium Tartrate

檸檬酸 Citric Acid

檸檬酸鈉 sodium citrate

纖維分解酵素(日本天野製藥株式會社)

3.1.2 實驗儀器

磁石加熱攪拌器

高壓滅菌釜

無菌操作台

分光光度計

抽氣幫浦

離心分離器

連續式進料切割機

pH 計

電子天平

3.1.3 實驗器材

燒杯 (100mL)

燒杯 (500mL)

燒杯 (1000mL)

量筒 (100mL)

錐形瓶 (250mL)

抽氣瓶 (500mL)

玻璃攪拌棒

酒精溫度計

藥杓

濾紙

布氏漏斗

球型吸量管

定量瓶 (1000mL)

磁石

試管

試管架

水浴鍋

微型吸量管

洗滌瓶

水晶瓶

3.2 實驗藥品配置

1. 1%DNS 呈色計: 稱取二硝基水楊酸 10g、酚 2g、亞硫酸鈉 0.5g、氫氧化鈉 10g 加水到一升。
2. 硫酸: 取 60g/L、80g/L、100g/L，配置成 0.6M、0.8M、1.0M。

3. 氫氧化鈉:取 32g/L、48g/L、64g/L，配置成 0.8M、1.2M、1.6M。
4. 檸檬酸 21.14 g/L 與檸檬酸鈉 29.41 g/L 配置成 0.1M。

3.3 實驗步驟

(一)、稻草粉製作

先將稻草剪至 3cm 左右，再放置連續式進料切割機絞碎。

(二)、溶液配置(H_2SO_4 、NaOH)

1. 分別配製 0.6M、0.8M、1.0M H_2SO_4 。
2. 分別配製 0.8M、1.2M、1.6M NaOH。

(三)、葡萄糖濃度檢測

1. 加入 3mL 的 DNS 試劑於 3mL 葡萄糖溶液之有蓋試管中。
2. 加該試管在 90°C 水浴中加熱 5~15 分，使呈紅棕色。
3. 加入 1mL 的 40%Potassium sodium tartarate 溶液，使呈色穩定。
4. 冷卻至室溫，並測其 575nm 之吸光度。
5. 檢量曲線之製作:
 - A. :精秤之葡糖糖，加水定容至 100mL 作為標準溶液。
 - B. :葡萄糖標準溶液各取 3mL，各置入 1~6，6 根試管中，各加入 3mL DNS 呈色劑。
 - C. :1~6 試管分別置入恆溫水槽中，於 90°C 加入加熱 5~15 分鐘，呈現紅棕色。
 - D. :分別加入 1ml，40%Potassium sodium tartarate 溶液使呈色穩定。
 - E. :冷卻至室溫，使用分光光度計於 575nm 測其吸光度，並校正曲線。

(四)、高溫高壓

1. 取稻草粉 20g 與配置 0.6M、0.8M、1.0M 硫酸溶液加入水晶瓶 400ml，放入滅菌釜進行高溫高壓。
2. 結束後進行抽氣過濾，取其液體後，中和至中性。

(五)、酶解

1. 取預處理後的稻草 1g，加入裝有 100mL 檸檬酸與檸檬酸鈉緩衝溶液 pH4.8 的 250mL 的三角瓶中，加纖維素酶 20mg(2%)
2. 將三角瓶放入恆溫水浴鍋，45°C 水解糖化 48hr。
3. 將取樣先加熱至 100°C 5min 使纖維素酶變性，冷卻至室溫，然後離心取上清液進行還原糖分析。

(六)、分光光度計

將(4)、(5)其液體加入 1mL DNS，測其還原糖含量。

第四章 結果與討論 (Results and discussion)

4.1 硫酸濃度對水解效率的影響

本實驗以稀酸法進行探討、比較，以 0.6M、0.8M、1.0M 的硫酸溶液，在溫度 121°C、1.2 大氣壓下對水解效率的影響，其實驗結果以硫酸溶液 1.0M 的效果為最佳，產率為最高。而再水解為第一次水解完成後所殘留之稻稈殘渣，拿來做第二次水解，可以觀察殘渣剩餘葡萄糖含量。

產率計算:稀酸水解可得最佳葡萄糖產率為 46.6%(2013.10.23 稻草產製酒精前處理程序之回顧) $[\text{濃度}/(\text{g 數} * \text{理論值} * 1000)] * 100\%$

稀酸濃度	水解吸光度	葡萄糖濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	產率 (%)	再水解吸光度	葡萄糖濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	產率 (%)
0.6	0.63	566.00	2.43	0.16	175.17	0.75
0.8	0.91	794.33	3.41	0.18	187.67	0.81
1.0	0.94	822.67	3.53	0.25	246.00	1.06

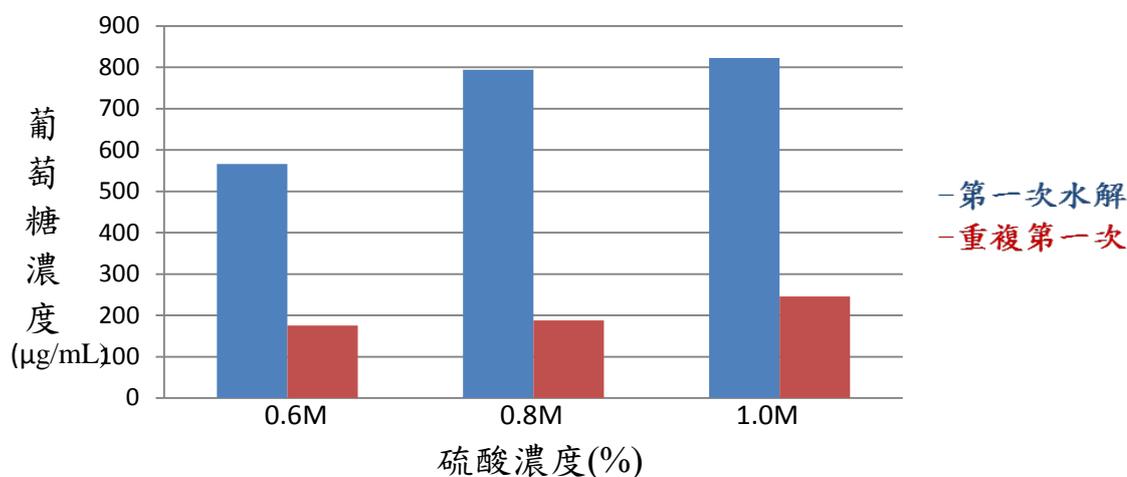


圖 4-1 硫酸濃度對水解效率的影響

4.2 木質素對稻稈水解的影響

本實驗以稀酸法進行探討、比較，以 0.6M、0.8M、1.0M 的硫酸溶液，在溫度 121°C、1.2 大氣壓下對水酸解效率的影響，觀察其脫木質素前後葡萄糖含量差距。使用硫酸濃度 1.0M 得到葡萄糖濃度為 822.67(ug/mL)，實驗得知 1M 的葡萄糖含量最高，脫木質素後的稻稈一樣使用硫酸濃度 1M，測得葡萄糖含量為 125.17(ug/mL)，兩者比較相差 6.5 倍的葡萄糖含量。

稀酸濃度	水解吸光度	葡萄糖濃度產 ($\mu\text{g/mL}$)	率 (%)	脫木質吸光度	葡萄糖濃度產 ($\mu\text{g/mL}$)	率 (%)
0.6	0.63	566.00	2.43	0.04	70.17	0.75
0.8	0.91	794.33	3.41	0.09	111.83	0.81
1	0.94	822.67	3.53	0.10	125.17	1.06

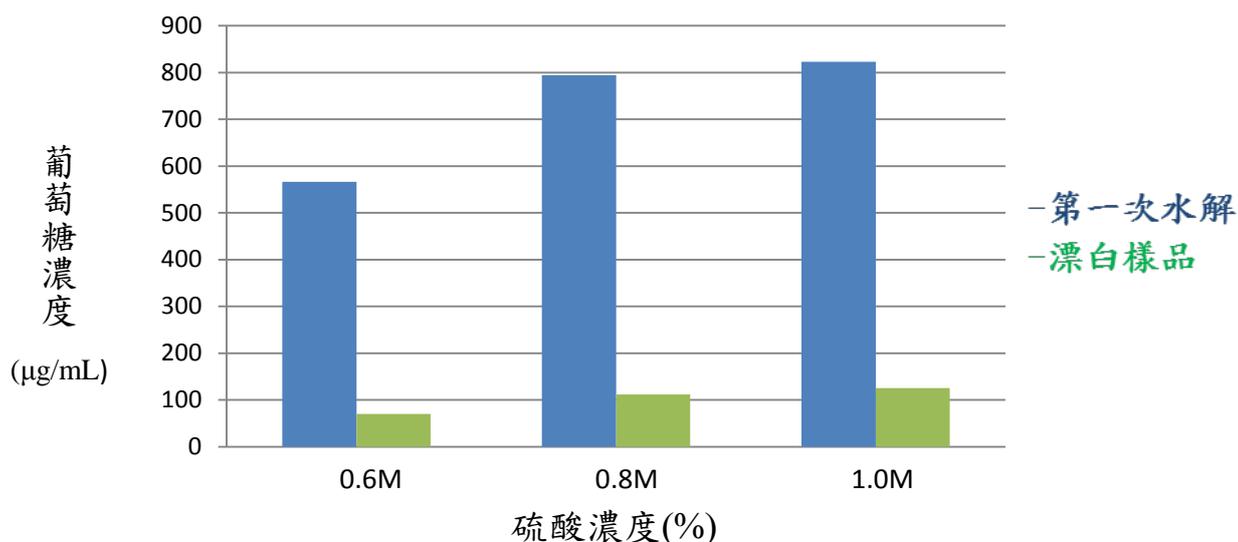


圖 4-2 木質素對稻稈水解的比較

4.3 水解時間及產率的影響

本實驗以稀酸法，在不同時間下以121°C、1.2 大氣壓下對酸水解產率的影響，其實驗結果平均值以水解時間 4hr 的葡萄糖產率最高，可以從結果得知水解時間對葡萄糖產率有相當大的影響，在時間愈久的情況下，其水解的效果會愈好。

時間 (hr)	吸光度	葡萄糖濃度 (µg/mL)	吸光度	葡萄糖濃度 (µg/mL)	平均值 (µg/mL)	產率 (%)
1	0.89	781.83	0.90	790.17	786.00	3.33
2	1.41	1215.17	1.37	1181.83	1198.50	5.15
3	1.58	1356.83	1.57	1348.50	1352.67	5.81
4	1.51	1298.50	1.75	1498.50	1398.50	6.00

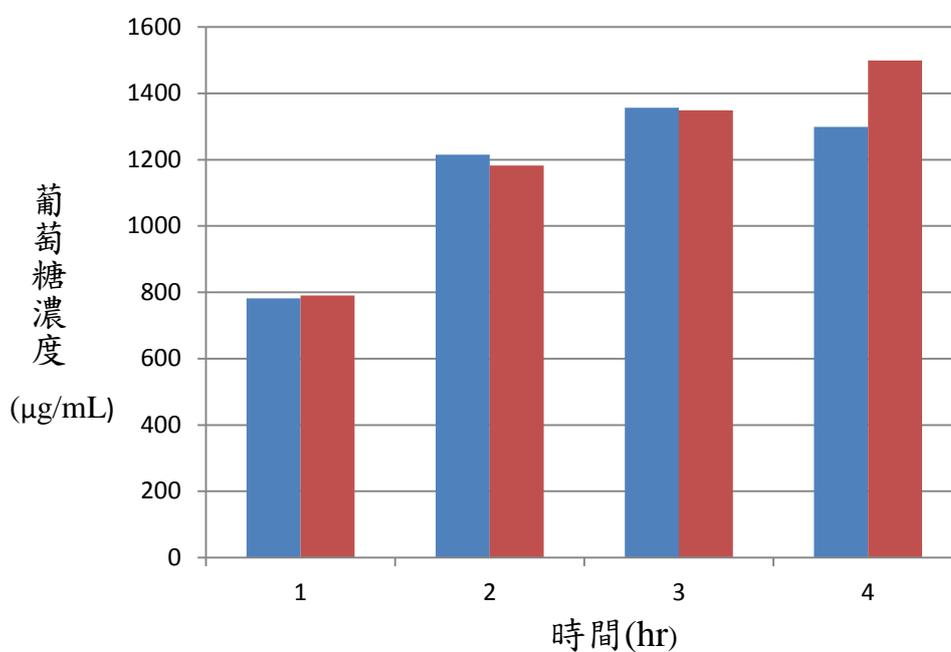


圖 4-3 水解時間及產率的影響

4.4 pH 值對纖維素水解效率的影響 (24 hr)

取 5g 稻草，加入裝有 100ml 檸檬酸與檸檬酸鈉緩衝液 pH 值 4、5、6 的 250 三角瓶中加入 2%、4%、6% 的纖維素分解酵素(日本天野製藥株式會社)，經過實驗水解糖化時間 24 hr 後，測其還原糖含量，結果以 pH6 效果最好，產率最佳。

酶量 (%)	pH4 吸光度	葡萄糖濃度 (µg/mL)	pH5 吸光度	葡萄糖濃度 (µg/mL)	pH6 吸光度	葡萄糖濃度 (ug/mL)
2	0.16	175.17	0.15	166.83	0.18	192.60
4	0.15	163.50	0.16	173.50	0.20	202.67
6	0.14	158.50	0.16	172.67	0.20	210.17

酶量 (%)	pH4 產率 (%)	pH5 產率 (%)	pH6 產率 (%)
2	0.75	0.72	0.83
4	0.70	0.74	0.87
6	0.68	0.74	0.90

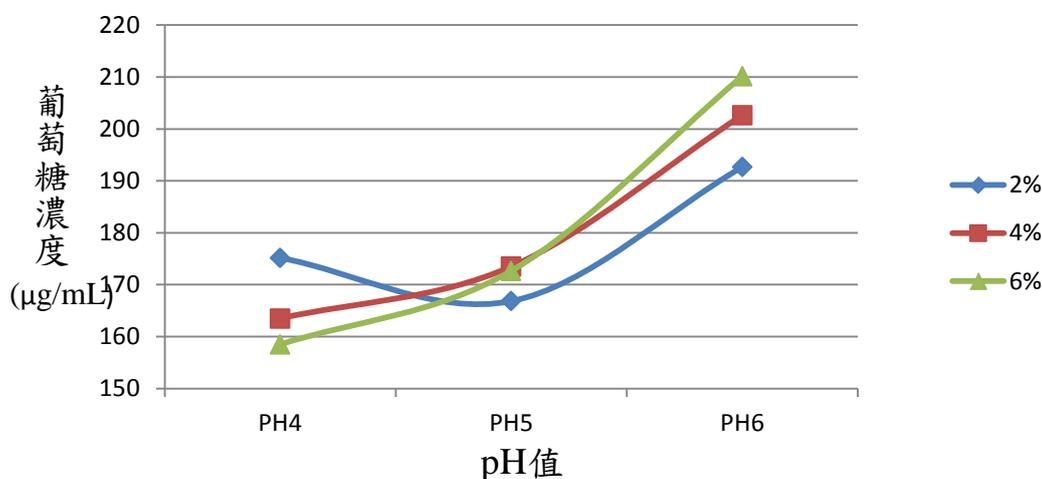


圖 4-4 pH 值對纖維素水解效率的影響

4.5 pH 值對纖維素水解效率的影響 (48 hr)

酶量 (%)	pH4 吸光度	葡萄糖濃度 (µg/mL)	pH5 吸光度	葡萄糖濃度 (µg/mL)	pH6 吸光度	葡萄糖濃度 (µg/mL)
2	0.21	198.50	0.20	198.50	0.20	203.50
4	0.21	205.17	0.20	205.17	0.20	206.83
6	0.21	216.83	0.17	178.50	0.20	208.50

酶量 (%)	pH4 產率 (%)	pH5 產率 (%)	pH6 產率 (%)
2	0.91	0.85	0.87
4	0.91	0.88	0.89
6	0.93	0.77	0.89

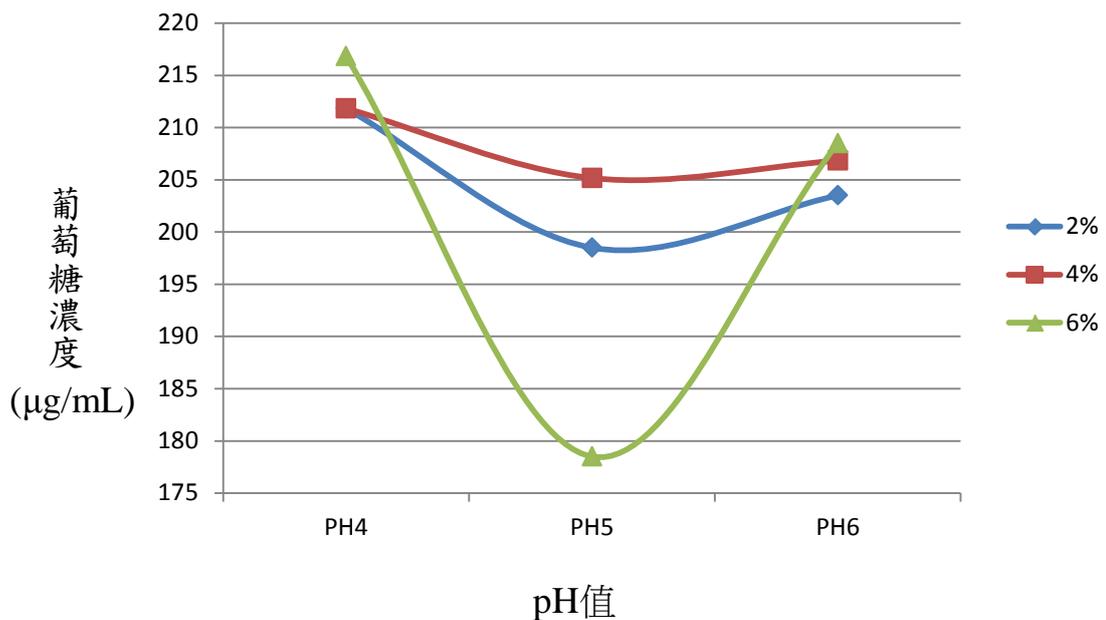


圖 4-5 pH 值對纖維素水解效率的影響

4.6 pH 值對纖維素水解效率的影響(72 hr)

酶量 (%)	pH4 吸光度	葡萄糖 濃度 (µg/mL)	pH5 吸光度	葡萄糖 濃度 (µg/mL)	pH6 吸光度	葡萄糖 濃度 (µg/mL)
2	0.23	231.80	0.17	185.17	0.30	286.83
4	0.23	231.83	0.19	195.17	0.27	263.50
6	0.22	220.17	0.18	188.50	0.25	246.83

酶量 (%)	pH4 產率 (%)	pH5 產率 (%)	pH6 產率 (%)
2	0.62	0.49	0.76
4	0.62	0.52	0.70
6	0.59	0.50	0.66

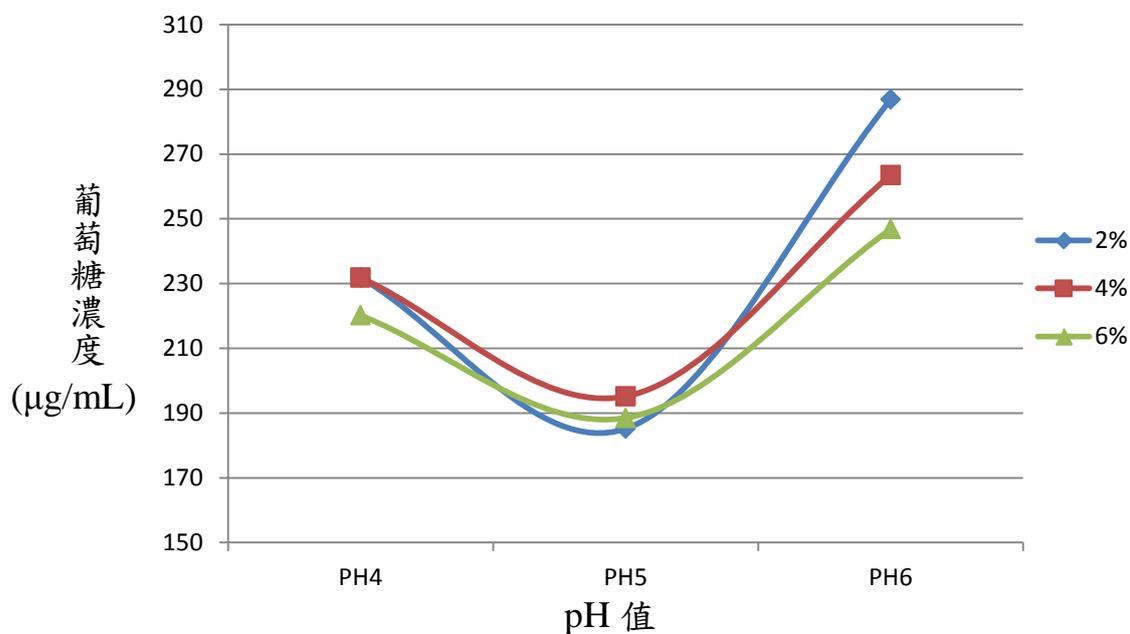


圖 4-6 pH 值對纖維素水解效率的影響

4.7 pH 值對纖維素水解效率的影響(144 hr)

酶量 (%)	pH4 吸光度	葡萄糖 濃度 (µg/mL)	pH5 吸光度	葡萄糖 濃度 (µg/mL)	pH6 吸光度	葡萄糖 濃度 (µg/mL)
2	0.29	280.17	0.32	306.83	0.39	363.50
4	0.32	306.83	0.31	296.83	0.46	423.50
6	0.62	556.83	0.54	493.50	0.64	573.50

酶量 (%)	pH4 產率 (%)	pH5 產率 (%)	pH6 產率 (%)
2	1.20	1.32	1.56
4	1.32	1.27	1.82
6	2.39	2.12	2.46

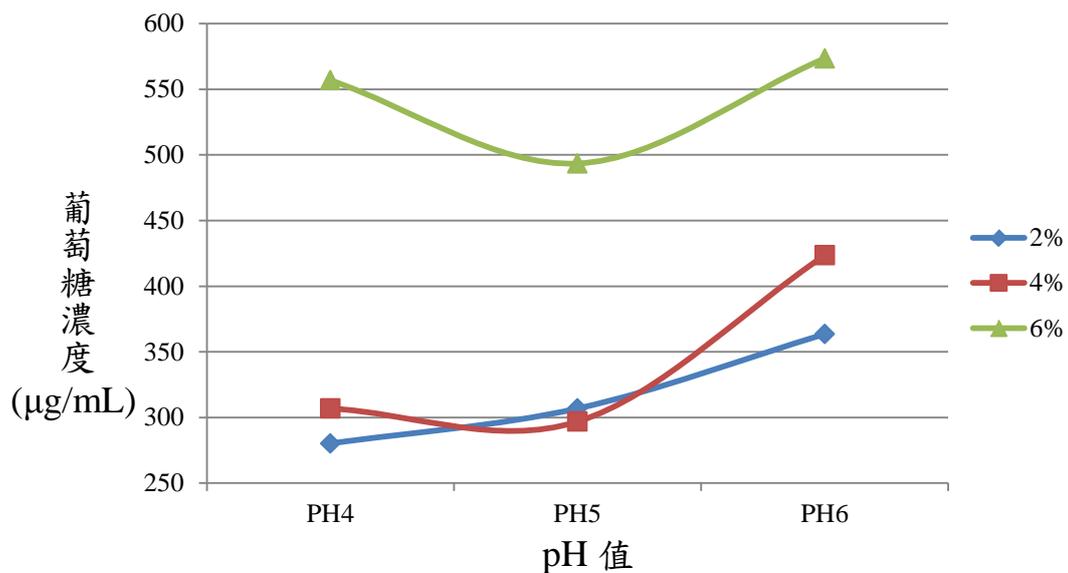


圖 4-7 pH 值對纖維素水解效率的影響

4.8 時間對纖維素水解的影響

這是以最佳條件: pH6、酶量 6% 時間不同下去做比較,時間越久,所獲得的葡萄糖濃度為最多。

時間 (hr)	24 hr ($\mu\text{g/mL}$)	48 hr ($\mu\text{g/mL}$)	72 hr ($\mu\text{g/mL}$)	144 hr ($\mu\text{g/mL}$)
葡萄糖濃度	210.17	208.5	246.83	573.5

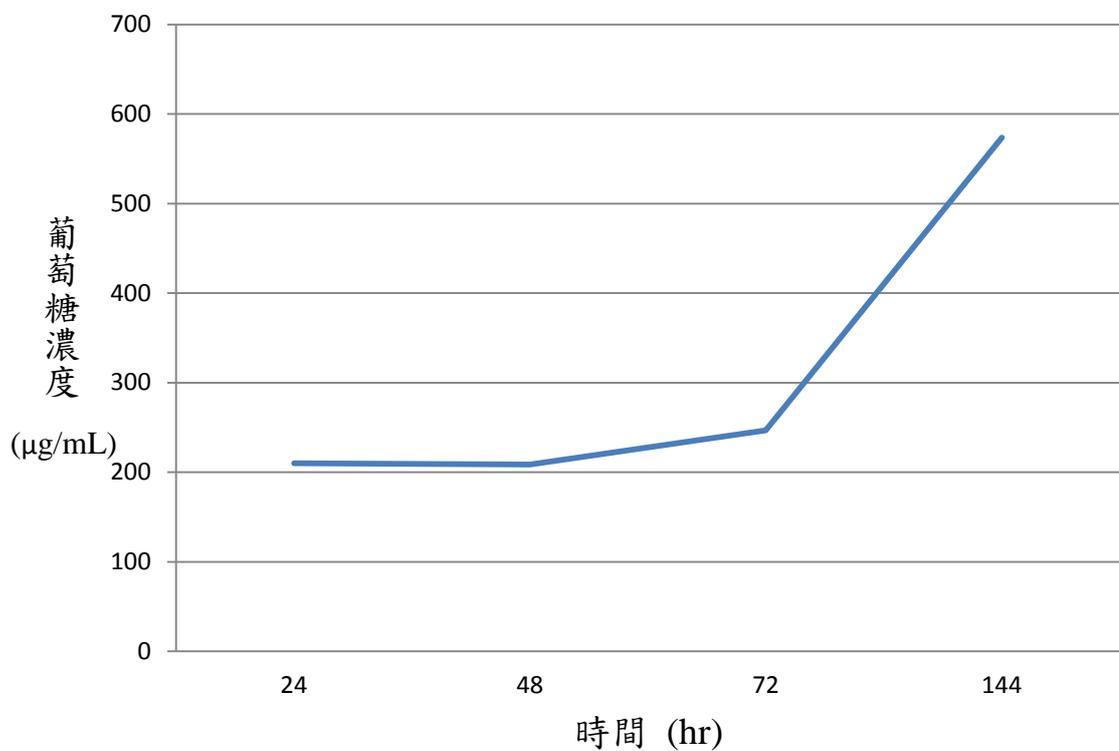


圖 4-8 時間對纖維素水解的影響

第五章 結論 (Conclusions)

實驗以稀酸法，再 121°C、1.2atm 下水解，如果要讓產率更佳，其硫酸濃度、時間長短、有無木質素影響很大；以實驗結果而言，硫酸濃度越高、溶液裡有木質素、時間越長的效果最佳，產率最好。

實驗以酵素水解法來看，實驗溶液中的 pH 值、酶量、時間長短對水解產率有很大的影響；就實驗結果而言，pH 值為 6、酶量為 6% 時間 144 hr 時效果最佳，產率最好。

稀酸法以及酵素水解法比較來看，稀酸法的效果比酵素水解法來的好，稀酸法最好條件在硫酸濃度 1.0M、水解時間 4hr 下葡萄糖濃度為 1498.50 (ug/mL)，而酵素水解法最好條件在酶量 6%、水解時間 144hr 下葡萄糖濃度為 573.50 (ug/mL)，以實驗結果來看：

1. 稀酸法水解時間小於酵素水解時間。
2. 酵素價格偏貴，稀酸法較為便宜。
3. 稀酸法葡萄糖濃度較酵素水解法葡萄糖濃度高。

實驗結果顯示：

稀酸水解法：

硫酸 1M 濃度下、時間 3 hr、稻稈濃度 20 g/L 時，最佳產率為 5.805%。

酵素水解法：

在 pH 6、時間 144 hr、稻稈濃度 5 g/L，最佳產率為 2.46%

参考文献 (References)

- Ahmed Z., Banu H., Rahman M. M., Akhter F., and Haque M. S. Microbial Activity on the Degradation of Lignocellulosic Polysaccharides. *Journal of Biological Sciences* , 10: p. 993-997 , (2001).
- Beguin P. and Lemaire M. The cellulosome : an exocellular , multiprotein Complex specialized in cellulose degradation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 31: p. 201-236 , (1996).
- Beguin P. and Anbert J.P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev.* 13:25 58,(1994).
- Bhat M. K. and Bhat S . Cellulose degrading enzymes and their potential Industrial applications. *Biotechnol.* 15:583 620,(1997).
- Bisaria V. S. and Ghose T. K Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products.*Enzyme and Microbial Technology.* 3:p. 90-104,(1981).
- Cosgrove D. J. Cell Walls: Structures , and Expansion. *Plant Physiology.* p.409-443 ,(1998).
- Carnit B.P. Fractionation and bioconversion of steam exploded wheat straw. *Bioresource Tcehnology.* p.39:165 , (1992) °

- Converse A.O., Kwarteng I. K., Grethlein H. E. and Ooshima H. Kinetics Grohmann K., Torget, R and Himmel M. Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 15,p. 59-80(1985).
- Heitz, M., Capek Menard E., Koeberle P. G., Gagne J., Chornet E., Overend R. P., Taylor J. D. and Yu E. Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale : optimization of steam explosion pretreatment conditions using the STAKE II technology. *Bioresour. Technol.* 35:p. 23-32,(1991).
- Knappert H., Grethlein H. and Converse A. Pretreatment of wood for enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.Symp.* 11:p. 67-77,(1980).
- Lynd L. R., Weimer P. J., Zyl W. H. V. and Pretorius I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Review.* 66,3,p. 506-577,(2002).
- Mosier N. , Wyman C. and Dale B. Features of promising technologies for Pretreatment of lignocellulose biomass. *Bioresource Technology* , 96 , p.673-686 , (2005).
- Ramos L. P., Breuil C. and Saddler J. N. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 34-35, p 37-48,(1992).
- Sun Y. and Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol Production: a review. *Bioresource Technology* ,83 ,p. 1-11 ,(2002)

- Subarmaniyan S and Prema P. Biotechnology of microbial xylanases : Enzymology , molecular biology , and application. Crit. Rev. Biotechnol.22 ,p. 33-64 ,(2002)

- Wood T. M. and Bhat M. K. Methods for measuring cellulose activities.Methods Enzymol.160, p87-112,(1988).

- Woodward J. Xylanases: functions , properties and applications. Top.Enzyme. Ferment.Biotechnol ,8 ,p. 9-30 ,(1984).

- 王玉高、貢士瑞、許文娟、盛晨，纖維素水解的研究進展，化工時刊，2009年 月 卷第 期

- 庄新姝、王樹榮、駱仲渙、安宏、岑可法，纖維素低濃度酸水解製取液體燃料試驗研究，浙江大學學報，40：第 997-1001 頁，(2006)。

- 李穩宏、吳大雄、高思，麥稈纖維酶解法產糖預處理過程公益條件，西北大學學報(自然科學版)，27：第 230-277 頁，(1997)。

- 林佑生、李文乾，2009。科學發展專題報導生質能源。

- 林彥妮，2008。以蒸煮爆碎搭配減浸泡前處理法提升稻殼糖化效率的研究，台北科技大學高分子研究所碩士論文。

- 唐愛民、梁文芷，超音波預處理對速生材木將纖維架構的影響，

聲學技術，19：第 78-85 頁(2000)。

- 郭家宏，2009。纖維素之溶解對其酵素醱化及發酵應用之研究，台灣科技達學化學工程系博士論文。
- 張名佳、蘇榮欣、齊威、何志敏，木質纖維素酶解糖化，化學進展，2009年5月21卷第5期
- 黃馨卉，稻稈稀硫酸水解對厭氧產氫之影響，逢甲大學綠色能源科技碩士學位學程碩士論文
- 齊倍慶，2001。從堆肥中篩選纖維素分解酵素生產菌及其酵素性質研究，清華大學生命科學所碩士論文。
- 維基百科—稻草介紹
- 雄健、葉君、梁文芷，微波對纖維素超分子結構的影響，華南理工大學學報，28：第 85-89 頁，(2000)。
- 劉俊敏，低耗能木質纖維素酸水解與暗發酵產氫之研究，逢甲大學綠色能源科技碩士學位學程碩士論文
- 劉德禮、謝林生，馬王录，木質纖維素預處理技術研究進展，釀酒科技，2009年1期
- 盧定強、萬洪貴，賈紅華，木質纖維素預處理技術之研究進展，生物加工過程，2:第11-16頁
- 戴上凱，熱穩定性纖維素分解細菌分離株之特性探討與親緣關係的研究，中山大學生物科學研究所博士論文，高雄市，(2004)。

- 羅翊璋，以蒸煮爆碎法對狼尾草進行前處理的研究，國立台北科技大學碩士論文，(2009)。

- 蘇遠志、黃世佑，1997。微生物化學工程學，台北市。

附錄

附錄一 高壓滅菌釜操作方法(濕熱法)

1. 啟動前檢查:

- (1) 檢查釜內鍋水是否足夠(若無鍋水則關閉排液閥,加入 2500ml 蒸餾水)。
- (2) 檢查排氣閥與排液閥於關閉位置。
- (3) 將需要滅菌之物品置入鐵籃後再放入滅菌釜內, 蓋上鍋蓋並鎖緊。

2. 啟動與關閉滅菌釜

- (1) 設定滅菌時間為 20min、溫度為121°C、啟動電源。
- (2) 滅菌釜鳴叫, 則滅菌結束, 關閉電源。
- (3) 微開排氣閥, 排除鍋內蒸氣至壓力錶歸零。
- (4) 微開排水閥, 等候5分鐘。
- (5) 穿戴棉質手套後, 旋開鍋蓋並取出滅菌物品。
- (6) 清潔滅菌釜等器具並且歸位。

附錄二 分光光度計原理操作說明

分光光度計是現代生物實驗室裡的常規儀器，其運作方式是採用一個可以產生多個波長的光源，從而產生特定波長的光源，光源透過測試樣品後，部分光源被吸收，計算測得樣品的吸光值。吸光值可以再轉化樣品濃度，吸光值越高表示濃度越高。

操作方法

1. 使用前設定

- (1) 設定波長至設定值。
- (2) 選擇吸光度功能進行測量(吸光度與透光率等功能可視需求調整)
- (3) 設定波長範圍。
- (4) 取空白比色管(蒸餾水)置入分光光度計並蓋上蓋子，加以歸零。

2. 量測待測物

將待測物倒入比色管並擦拭乾淨，置入光度計內，蓋上蓋子，直接讀取紀錄即可。

註：

- (1) 裝置比色管前必須擦拭乾淨，裝置時比色管之霧面在左右，透明面在前後，手指不可觸碰透光面(光徑)
- (2) 若需重複使用填裝比色管，則填裝前必須多次潤洗，比色管若產生氣泡則必須除去，避免產生讀數誤差。

附錄三 抽氣過濾器操作方法

一、組合過濾裝置

- (1) 將真空幫浦之抽氣管接上集液瓶。
- (2) 將布氏漏斗與抽氣瓶組合。
- (3) 取一抽氣管連結上上述(1)(2)之集液瓶與抽氣瓶。
- (4) 取一或二張潤濕過的濾紙，平放放置在布氏漏斗內的多孔平面上，開啟電源即可開始操作。

二、過濾操作

- (1) 取一張濾紙平放放置在布氏漏斗的多孔平面上，並加以濕潤（假設若欲過濾液體過於濃稠，則可鋪上兩張濾紙，防止濾紙破裂滲透）。
- (2) 把布氏漏斗接上抽氣瓶。
- (3) 開啟真空幫浦電源開始抽氣過濾。
- (4) 抽氣過濾完畢，移出濾紙上之過濾物與抽氣瓶濾液。

附錄四 葡萄糖檢量線

($\mu\text{g/mL}$)	葡萄糖(g)	水(mL)	吸光度(5mL)
0	0	5	-0.024
10	0.01	4.99	-0.02
20	0.02	4.98	-0.019
50	0.125	4.875	-0.01
100	0.25	4.75	0.046
200	0.5	4.5	0.16
400	1	4	0.431
600	1.5	3.5	0.635
800	2	3	0.954
1000	2.5	2.5	1.199
1600	4	1	1.821

濃度	0	10	20	50	100	200	400	600	800	1000	1600
吸光度	-0.024	-0.020	-0.019	-0.010	0.046	0.160	0.431	0.635	0.954	1.199	1.821

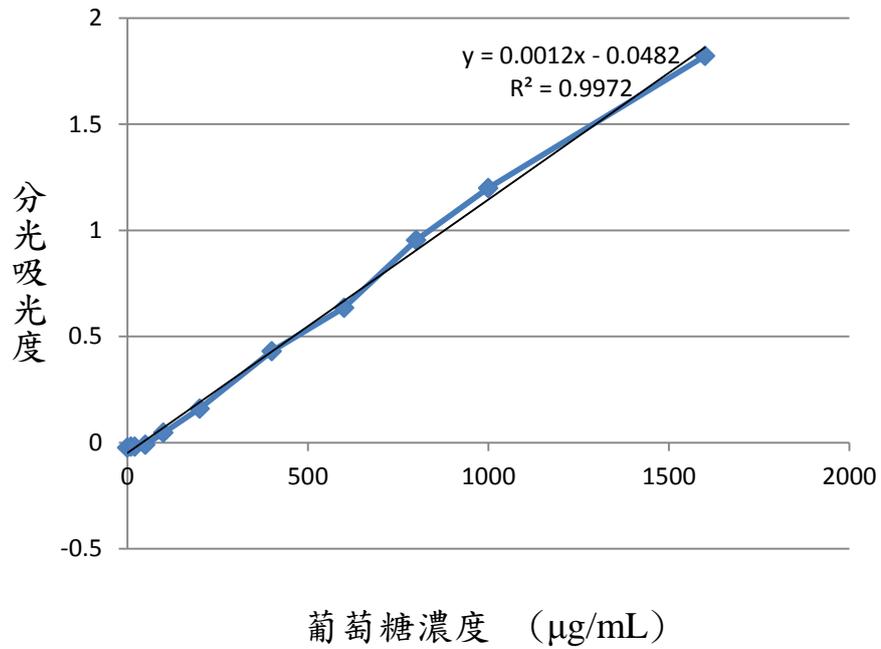


圖 5-1 葡萄糖檢量線(波長 575nm)