

以黴菌及酵母菌共分解木質纖維素生產酒精之研究

潘仕穎、吳芳禎

E-mail: 322079@mail.dyu.edu.tw

摘要

里氏木霉(*Trichoderma reesei*, *T. reesei*)具有完善的纖維素水解酵素系統，然而*T. reesei*所分泌之胞外酵素 α -glucosidase活性極低，但能與黑麴菌(*Aspergillus niger*, *A. niger*)產生協同作用，使纖維素更有效率醱化(saccharification)。而啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*)有不錯酒精發酵能力。硫酸鹽製漿所形成的紙漿，木質素大部分已被去除，具有純度較高纖維素。本研究利用紙漿散漿配製0.02 g/mL做為醱化基質，在六天培養中，探討單一菌株及混合菌株培養效果，利用DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)測定不同天數中纖維素水解酵素的活性，並進行葡萄糖和乙醇含量分析。結果顯示在單一菌株培養下，*T. reesei*在培養第一天時有最佳的纖維酵素活性，分別為exoglucanase (avicelase) 0.45 IU/mL、endoglucanase (CMCase) 0.59 IU/mL以及filterase 0.21 IU/mL，而*T. reesei*分泌之胞外酵素 α -glucosidase量極低，其活性幾乎等於零。隨著培養天數的增加，葡萄糖含量逐漸減少，到第六天剩下4.86 mg/mL；而乙醇含量顯著增加到0.85 mg/mL。*S. cerevisiae*培養液中亦有少量纖維酵素活性，以exoglucanase活性最大0.15 IU/mL，而 α -glucosidase和filterase在培養六天中活性趨近於零。培養液中葡萄糖含量很少，均無法測得。乙醇含量以第零天的4.53 g/L最多，而後逐漸下降，到第六天為3.44 g/L。*T. reesei*與*A. niger*在共同培養第一天，endoglucanase活性最大1.69 IU/mL。exoglucanase、 α -glucosidase與filterase活性最大值分別出現在 α -exoglucanase 1.50 IU/mL(第零天)、 α -glucosidase 1.66 IU/mL(第一天)及filterase 0.35 IU/mL(第三天)。而兩菌共同培養時，葡萄糖含量亦呈減少趨勢，由4.26降至1.47 mg/mL，而第六天乙醇能增加到1.11 g/L。*T. reesei*、*A. niger*以及*S. cerevisiae*在六天混合培養下，endoglucanase活性在培養五天時有最大值1 IU/mL。exoglucanase、 α -glucosidase與filterase活性最大值分別出現在 α -exoglucanase 0.32 IU/mL(第五天)、 α -glucosidase 0.33 IU/mL(第一天)及filterase 0.26 IU/mL(第二天)。葡萄糖含量以第零天為最多1.93 mg/mL，乙醇含量在第4天增加到3.55 g/L。

關鍵詞：乙醇、內切型纖維分解酶、外切型纖維分解酶、纖維二糖、木質纖維素

目錄

封面內頁 簽名頁 授權書 iii 中文摘要 iv 英文摘要 vi 誌謝 viii 目錄 ix 圖目錄 xii 表目錄 x	封面內頁 簽名頁 授權書 iii 中文摘要 iv 英文摘要 vi 誌謝 viii 目錄 ix 圖目錄 xii 表目錄 xiv
第一章 緒言 1	第二章 文獻回顧 3
第一節 生質能源 3	一、簡介 3
二、生質能源的種類 4	第二節 生質酒精 6
一、生產方法 6	二、生產原料 6
第三節 木質纖維素 10	一、木質纖維素原料種類 10
二、紙漿介紹 13	第四節 纖維素分解酵素 17
一、種類 17	二、纖維水解酵素作用機制 21
三、纖維酵素系統水解產物之回饋抑制 23	第五節 微生物 23
一、具分解纖維素酵素之微生物 23	二、乙醇生產菌 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) 27
第六節 生質酒精製程 27	一、目前應用程序 27
第三章 材料與方法 31	第一節 材料 31
一、菌種 31	二、紙漿 31
三、試藥 31	四、儀器設備 32
第二節 方法 32	一、菌液製備 32
二、紙漿製備 33	三、菌量測定 33
四、還原糖測定法 34	五、纖維素分解酵素活性測試 36
六、葡萄糖和乙醇之分析 37	第四章 結果與討論 38
第一節 以單一菌株分解紙漿生產酒精 38	一、以 <i>Trichoderma reesei</i> 分解紙漿 38
二、以 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 分解紙漿 46	第二節 以 <i>Trichoderma reesei</i> 及 <i>Aspergillus niger</i> 生產酒精 53
一、酵素系統活性變化 53	二、菌量變化 53
三、葡萄糖及乙醇含量變化 54	第三節 以 <i>Trichoderma reesei</i> 、 <i>Aspergillus niger</i> 及 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 混合培養生產酒精 60
一、酵素系統活性變化 60	二、菌量變化 60
三、葡萄糖及乙醇含量變化 61	第四節 單一菌株培養及混合培養時葡萄糖和酒精含量探討 67
一、葡萄糖含量分析 67	二、酒精含量分析 68
第五章 結論 71	參考文獻 73
圖一、典型纖維素轉化酒精製程 9	圖二、纖維素結構 12
圖三、複合纖維酵素體系 20	圖四、非結晶和結晶型纖維素水解作用 22
圖五、發酵單元與酵素水解單元之整合設計 28	圖六、不同基質所釋放之還原糖量 (A1組 - <i>T. reesei</i>) 41
圖七、不同培養天數exocellulase、endoglucanase、 α -glucosidase及filterase活性 (A1組 - <i>T. reesei</i>) 42	圖八、培養六天後 <i>T. reesei</i> 菌量變化 (A1組) 44
圖九、培養液HPLC圖 (A1組 - <i>T. reesei</i>) 45	圖十、不同基質所釋放之還原糖量 (A2組 - <i>S. cerevisiae</i>) 48
圖十一、不同培養天數exocellulase、endoglucanase、 α -glucosidase及filterase活性 (A2組 - <i>S. cerevisiae</i>) 49	圖十二、培養六天後 <i>S. cerevisiae</i> 菌量變化 (A2組) 51
圖十三、培養液HPLC圖 (A2組 - <i>S. cerevisiae</i>) 52	圖十四、不同基質所釋放之還原糖量 (B組 - <i>T. reesei</i> and <i>A. niger</i>) 55
圖十五、不同培養天數exocellulase、endoglucanase、 α -glucosidase及filterase活性 (B組 - <i>T. reesei</i> and <i>A. niger</i>) 56	圖十六、培養六天後B組(<i>T. reesei</i> and <i>A. niger</i>)總菌量 58
圖十七、培養液HPLC圖 (B組 - <i>T. reesei</i> and <i>A. niger</i>) 59	圖十八、不同基質所釋放之還原糖量 (C組 - <i>T. reesei</i> 、 <i>A. niger</i> and <i>S. cerevisiae</i>) 62
圖十九、不同培養天數exocellulase、endoglucanase、 α -glucosidase及filterase活性 (C組 - <i>T. reesei</i> 、 <i>A. niger</i> and <i>S. cerevisiae</i>) 63	圖二十、培養六天後C組(<i>T. reesei</i> 、 <i>A. niger</i> and <i>S. cerevisiae</i>)總菌量 65
圖二十一、培養液HPLC圖 (C組 - <i>T. reesei</i> 、 <i>A. niger</i> and <i>S. cerevisiae</i>) 66	圖二十二、在A1、A2、B及C組中，葡萄糖含量的變化 69
圖二十三、在A1、A2、B及C中，乙醇含量的變化 70	表一、

常見農業與一般廢棄物中纖維素、半纖維素與木質素組成 11 表二、化學紙漿與原木化學成分 16 表三、可分解纖維素之菌株 26 表四、DNS試劑組成成份 35 表五、T. reesei培養液中菌量、葡萄糖及乙醇含量變化 43 表六、S. cerevisiae培養液中菌量、葡萄糖及乙醇含量變化 50 表七、T. reesei與A. niger共同培養下菌量、葡萄糖及乙醇含量變化 57 表八、T. reesei、A. niger和S. cerevisiae共同培養下菌量、葡萄糖及乙醇含量變化 64

參考文獻

- 1、王香愛。2009。生物質能的轉化和利用研究。化工科技 17(1):51-55。
- 2、石家興和陳幸德。2009。中國生質沼氣研發現況與政策。農業生技產業季刊 20:94-98。
- 3、朱文深。1983。利用甜高粱原料生產酒精燃料之研究。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。台北市。
- 4、李文翔。2008。以共固定糖化菌及Saccharomyces cerevisiae生產甘藷生質酒精。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。台北市。
- 5、杜紫軍。1992。多種分析儀器在製漿蒸煮控制及紙漿木質素含量測定上之應用比較。國立台灣大學森林學研究所博士論文。台北市。
- 6、林俊義。2007。台灣地區生質酒精作物評估。農業試驗所技術服務 70:1-6。
- 7、林俊義。2006。國內外生質能源發展潛力與方向。林立夫等編著，"生質能源開發與利用"，第39-55頁。國立台灣大學生化科技學系出版。
- 8、林則旆。2008。利用微生物將纖維素廢棄物轉化為生質酒精。大葉大學生物產業科技學系研究所碩士論文。彰化縣。
- 9、胡俊榮。2002。玉米聚木糖分子性質對其聚木糖降解性及寡糖組成之影響。靜宜大學食品營養學系碩士論文。台中縣。
- 10、袁振宏、吳創之和馬隆龍。2004。生物質能利用原理與技術。化學工業出版社。北京。第8-11頁。
- 11、郭家倫、陳威希、陳文恆、陳盛變、門立中、黃文松和湯俊彥。2006。核研所纖維素產製酒精技術之研發。林立夫等編著，"生質能源開發與利用"，第57-67頁。國立台灣大學生化科技學系出版。
- 12、郭明朝。2007。核研所纖維酒精發展之策略規劃。2007年台灣生質酒精發展趨勢研討會論文集。第7-19頁。
- 13、陳乃菁、余碧、邱文石和曾浩洋。1993。碳源及培養條件對Trichoderma reesei生產纖維素之影響。農林學報 42:9-17。
- 14、陳文恆、郭家倫、黃文松和王嘉寶。2007。纖維酒精技術之發展。農業生技產業季刊 9:62-69。
- 15、葉丁源。1997。嗜高溫放線菌纖維素分解酵素之探討。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。台北市。
- 16、黃俊宏。1993。汽油添加酒精作為汽車燃料之可行性研究。國立台灣大學機械工程研究所碩士論文。台北。
- 17、黃郁菁。2009。新型反應器於纖維素生質酒精中之同步糖化與發酵技術開發與應用。私立元智大學生物科技與工程研究所碩士論文。桃園縣。
- 18、黃進、夏濤和鄭化。2009。生物質化工與生物質材料。第82-116頁。化學工業出版社。北京。
- 19、賀運春。2008。真菌學。第122-254頁。中國林業出版社。北京。
- 20、經濟部能源局。2005。能源政策白皮書。台北:經濟部能源局
- 21、楊萬發(編)。1993。工業減廢技術手冊2 - 造紙工業。第53-87頁。經濟部環保署工業減廢聯合輔導小組。台灣。
- 22、楊盛行。2005。生物性肥料的開發與應用潛力。農業生技產業季刊 4:9-17。
- 23、楊盛行和陳盟靜。2000。高溫放線菌對堆肥化過程的影響。中華生質能源學會會誌19(3-4):115-127。
- 24、楊顯整。2008。清潔替代燃料二甲醚概述。綠基會通訊。第6-9頁。
- 25、劉廣青、董仁杰和李秀金。2009。生物質能源轉化技術。第130-160頁。化學工業出版社。北京。
- 26、潘仕穎和吳芳禎。2009。以Trichoderma reesei酵素水解紙漿生產乙醇。台灣農業化學年會研討會摘要。第60頁。國立台灣大學。台北市。
- 27、潘仕穎、吳芳禎、吳達民、廖元有、吳菁蓉和鄭詩卿。2009。Trichoderma reesei及Aspergillus niger酵素水解紙漿生產乙醇。台灣食品科學技術學會年會研討會摘要。第124頁。國立宜蘭大學。宜蘭縣。
- 28、Adsul, M. G., Ghule, J. E., Singh, R., Shaikh, H., Bastawde, K. B., Gokhale, D. V. and Varma, A. J. 2004. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulose and xylanase production. Carbohydrate Polymers 57:67-72.
- 29、Aiello, C., Ferrer, A. and Ledesma, A. 1996. Effect of alkaline treatments at various temperatures on cellulase and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with Trichoderma Reesei QM 9414. Bioresource Technology 57:13-18.
- 30、Bayer, E. A., Shimon, L. J. W., Shoham, Y. and Lamed, R. 1998. Cellulosomes-structure and ultrastructure. Journal of Structural Biology 124:221-234.
- 31、Be'guin, P. 1987. Cloning of cellulase gene. Critical Reviews in Biotechnology 6:129-162.
- 32、Bhat, M. K. and Bhat S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnology Advances 15:583-620.
- 33、Binder, A. and Ghose, T. K. 1978. Adsorption of cellulose by Trichoderma viride. Biotechnology and Bioengineering 20:1187-1199.
- 34、Bisaria, V. S. and Ghose, T. K. 1981. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. Enzyme and Microbial Technology 3:90-104.
- 35、Chen, M., Xia, L. and Xue, P. 2007. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. International Biodeterioration and Biodegradation 59:85-89.
- 36、Chen, S. and Wayman, M. 1991. Cellulase production induced by carbon sources derived from waste newspaper. Process Biochemistry 26:93-100.
- 37、Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R. and Chen, C. 2007. Ensiling agricultural residues for bioethanol production. Applied Biochemistry and Biotechnology 143:80-92.
- 38、Chen, M., Zhao, J and Xia, L. 2008. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. Carbohydrate Polymers 71:411-415.
- 39、Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure & Applied Chemistry 59(2):257-268.
- 40、Gi'rio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S. and ?ukasik, R. B. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. Bioresource Technology 101:4775-4800.
- 41、Gokhale, D. V., Patil, S. G. and Bastawde, K. B. 1991. Optimization of cellulase production by Aspergillus niger NCIM 1207. Applied Biochemistry and Biotechnology 30:99-109.
- 42、Gunjekar, T. P., Sawant, S. B. and Joshi, J. B. 2001. Shear deactivation of cellulose, exoglucanase, endoglucanase, and -glucosidase in a mechanically agitated reactor. Biotechnology Progress 17:1166-1168.
- 43、Joseph, H. 2005. Alcohol Fueled Vehicles & Flex Fuel Vehicles-The Ethanol application as vehicular fuel in Brazil. Brazilian Automotive Industry Association.
- 44、Karimi, K., Brandberg, T., Edebo, L. and Taherzadeh, M. J. 2005. Fed-batch cultivation of Mucor indicus in dilute-acid lignocellulosic hydrolyzate for ethanol production. Biotechnology Letters 27:1395-1400.
- 45、Kwon, K. S., Kang, H. G. and Hah, Y. C. 1992. Purification and characterization of two extracellular beta-glucosidases from Aspergillus nidulans. FEMS Microbiology Letters 76:149-153.
- 46、Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. and Pretorius, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.

Microbiology and Molecular Biology Reviews 66:506-577. 47、 Lynd, L. R., van Zyl, W. H., McBride, J. E. and Laser, M. 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current opinion in biotechnology* 16:577-583. 48、 Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and Bioengineering* 6:21-33. 49、 Ng, T. K. and Zeikus, J. G.. 1982. Differential metabolism of cellobiose and glucose by *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Journal of Bacteriology* 150:1391-1399. 50、 Ohgren, K., Bengtsson, O., Gorwa-Grauslund, M. F., Galbe, M., Hahn-Hagerdal, B. and Zacchi, G.. 2006. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology* 126:488-498. 51、 Reese, E. T., Sin, R. G. H. and Levinson, H. S. 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology* 59:485-497. 52、 Rogers, G. M., Jackson, S. A., Shelver, G. D. and Backer, A. A. W. 1992. Anaerobic degradation of lignocellulosic substrates by a 1,4- β -xyylanolytic *Clostridium* species novum. *International Biodeterioration and Biodegradation* 29:3-17. 53、 Roger, M. R., Roger, P., James, S. H., Jeffrey S. R. and Mandla, A. T. 2005. Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites. CRC Press 37-62. 54、 Saha, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30:279-291. 55、 Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A. and Wu, Y. V. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biotechnology Progress* 21:816-822. 56、 Salamitou, S., Raynaud, O., Lemaire, M., Coughlan, M., Be'guin, P. and Aubert, J. P. 1994. Recognition specificity of the duplicated segments present in *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelD and in the cellulosome-integrating protein CipA. *Journal of Bacteriology* 176:2822-2827. 57、 Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyyssö"nen, E., Bhatia, A., Ward, M. and Penttilä", M. 2002. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry* 269:4202-4211. 58、 Shackford, L. D. 2003. A comparison of pulping and bleaching of kraft softwood and eucalyptus pulps. 36th International Pulp and Paper Congress and Exhibition. October 13-16. Sao Paulo, Brazil. 59、 Shetty, A. S. and Gaertner, F. H. 1975. Kynureninase-Type enzymes of *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, and *Pseudomonas fluorescens*: further evidence for distinct kynureninase and hydroxykynureninase activities. *Journal of Bacteriology* 122:235-244. 60、 Sprey, B. and Bochem, H. P. 1993. Formation of cross-fractures in cellulose microfibril structure by an endoglucanase-cellobiohydrolase complex from *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiology Letters* 106:239-243. 61、 Stahlberg, J., Johansson, G. and Pettersson, G.. 1988. A binding-site-deficient, catalytically active, core protein of endoglucanase III from the culture filtrate of *Trichoderma reesei*. *European Journal of Biochemistry* 173:179-183. 62、 Sternberg, D. 1976. Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnology and Bioengineering symposium* 6:35-53. 63、 Sun, Y. and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83:1-11. 64、 Wood, T. M. 1985. Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochemical Society Transactions* 13:407-410. 65、 Yu, Z. and Zhang, H. 2004. Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 93:199-204. 66、 Zhang, Q., Lo, C. M. and Ju, L. K. 2007. Factors affecting foaming behavior in cellulose fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Bioresource Technology* 98:753-760. 67、 Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkestein, M and Picataggio, S. 1995. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* 267:240-243.