

第二章 文獻回顧

2.1 再生能源

2.1.1 再生能源技術與種類

由於石油的大量開採與使用，造成在經濟上與生活環境上的衝擊，為因應使用匱乏之餘，在能源的開發與運用不可忽視，也是各國最主要的研究課題。再生能源意即可再生或新生之能源，可永續使用而不枯竭，再生能源之技術層面多而廣泛，包括物理、化學、生物上的開發，在物理與化學發展技術上包括風力、水力、地熱能、海洋能與太陽能，在生物轉換技術方面為固態衍生燃料技術、富油脂藻類養殖或採收技術、陸生能源作物耕收技術、醱酵 (fermentation) 與生物菌種方式等，這些生質能包括生質柴油、生質酒精、氣體燃料、燃料電池、氫能等 (Tsai *et al.*, 2004；蔡氏，2003)。

2.1.2 生質能

生質能 (biomass energy, bio-energy)來自於生質物 (biomass)的轉換獲得之可利用能源。生質能主要以生質廢棄物質與其它可分解性廢棄物，包括農作物殘渣、森林活動或開發所產生之廢棄物、都市廢棄物質、廚餘與污水、污泥、廢紙、薪柴、製糖作物、水生植物、能源作物、蔗渣、稻殼、稻稈、垃圾掩埋與堆肥，可分解性廢棄物包括裂解油、石油焦、廢輪胎，此類物質皆可作為生質能來源進行轉化 (Matsumura *et al.*, 2005；Yoshioka *et al.*, 2005；吳氏，2004)。

生物質轉換技術包括生物化學與物理轉換技術 (bio-/chemical conversion) 和熱轉換 (thermal conversion)。生物化學轉換技術為醱酵 (fermentation)、酯化 (esterification)、木質纖維素 (ligno-cellulose) 水解技術 (Demirbas, 2001)，產生沼氣、生質酒精、氣體燃料 (如Fig. 2.1, Van Wyk, 2001)、燃料電池、氫能、生質柴油等 (Wahlund *et al.*, 2004；Ramachandra *et al.*, 2000)。

熱轉換技術為氣化技術 (gasification)、熱分解技術 (pyrolysis)、裂解 (cracked)與垃圾焚化方式產生合成燃氣 (syngas)、燃油或發電等 (Tomasi *et al.*, 2006；Luo *et al.*, 2004)。物理轉換包括破碎、分選、乾燥、混合添加劑及成型等過程製成固態衍生燃料 (吳氏，2004)。

以生物轉換技術發展能源，可達到廢棄物產能之外，容易管理且方便操作，利用這些改良的生質能轉換技術，可解決部分有關環境衝擊的問題，優點為提供低硫燃料、廉價能源、減少垃圾並轉換成燃料、易操作。

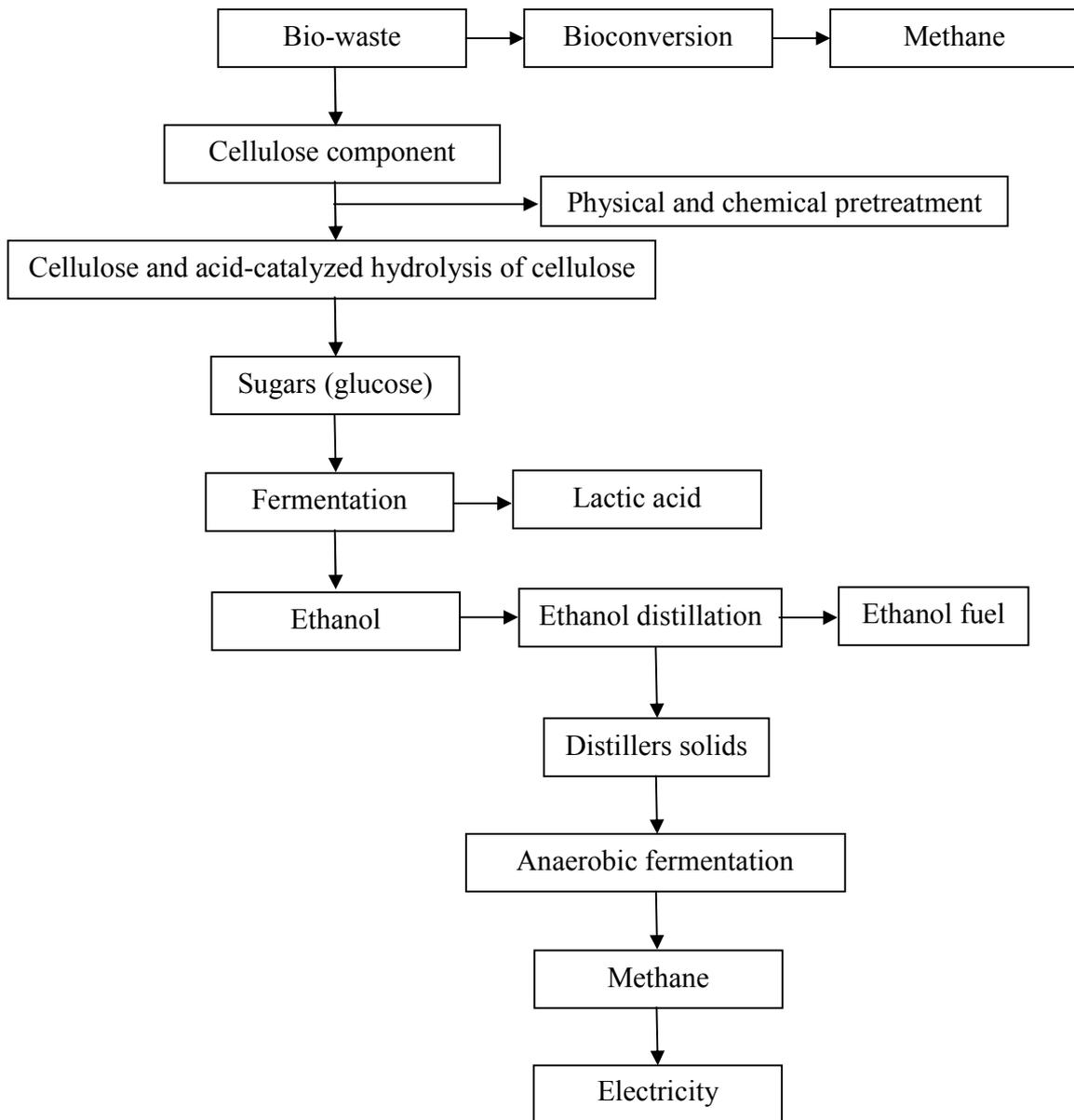


Fig. 2.1 Development of biowaste as a resource for bioproduct synthesis.

(Van Wyk, 2001)

2.2 纖維素 (Cellulose)

2.2.1 纖維素結構

在都市、森林與農業廢棄物中，纖維質廢棄物約佔有 40-70 % (Burrell *et al.*, 2004 ; Van Wyk, 2001)纖維素含量甚高。纖維素在自然界中是一種很豐富的多醣體 (polysaccharide)，且不同來源之纖維素其個別紙類之纖維素含量與結構不同，如 Table 2.1 所示，不同廢棄物質含有之纖維素含量百分比不同。纖維素對環境來說更是種友善的生質材料，亦可再經生物轉換成其它再生能源，如乙醇或甲烷，近年有許多學者發現以纖維素或纖維質廢棄物進行生物分解產能之研究比直接焚化更具有能源再生的潛能 (Cooney *et al.*, 1987 ; Van Wyk, 2002 ; Cowan, 1992; Yang *et al.*, 2004 ; Thanakoses *et al.*, 2003)。

纖維素是植物結構的主要物質 (Fig. 2.2)，其主要以D-glucose為基本單體，單體之間的鍵結藉由 β -1, 4-glucosidic bonds 聚合成直鏈狀巨分子，與相鄰的葡萄糖分子重複形成直鏈狀巨分子，而鏈的長度約為100~14,000個葡萄糖分子，鏈與鏈之間，利用氫鍵彼此鍵結，以平行排列並折疊成緊密且結晶度高的多醣體，纖維長鏈之間的氫鍵鍵結形成穩固結構的結晶型 (crystalline domain)纖維 (Fig. 2.3)，具有極穩定不溶於水且不易分解的特性；但不穩固的鍵結則會呈現鬆散的非結

晶型 (amorphous domain)纖維結構 (Nishino *et al.*, 2004 ; Mansfield and Meder, 2003 ; Hinterstoisser *et al.*, 2003) 。

Table 2.1 Composition and content percentage of different cellulose sources.

	Cellulose %	Lignin %	Hemicellulose %	References
Filter paper	100	-	-	(Sun and Cheng., 2002)
Office paper	89-99	-	-	(Sun and Cheng., 2002)
	71±0.26*	nd**	nd	
Card board	59.7±0.1	14.2±0.2	13.8±0.2	(Yáñez <i>et al.</i> , 2004)
	40±0.4*	nd	nd	
News paper	40-55	18-30	25-40	(Sun and Cheng., 2002)
	64±0.93*	nd	nd	
Rice straw	32-47	5-24	19-27	(Inglesby <i>et al.</i> , 2005)
	7±0.05*	nd	nd	

* Cellulose content in different sources determined in this study by anthrone-sulfonic acid colorimetric method.

**nd, not determined in this study.

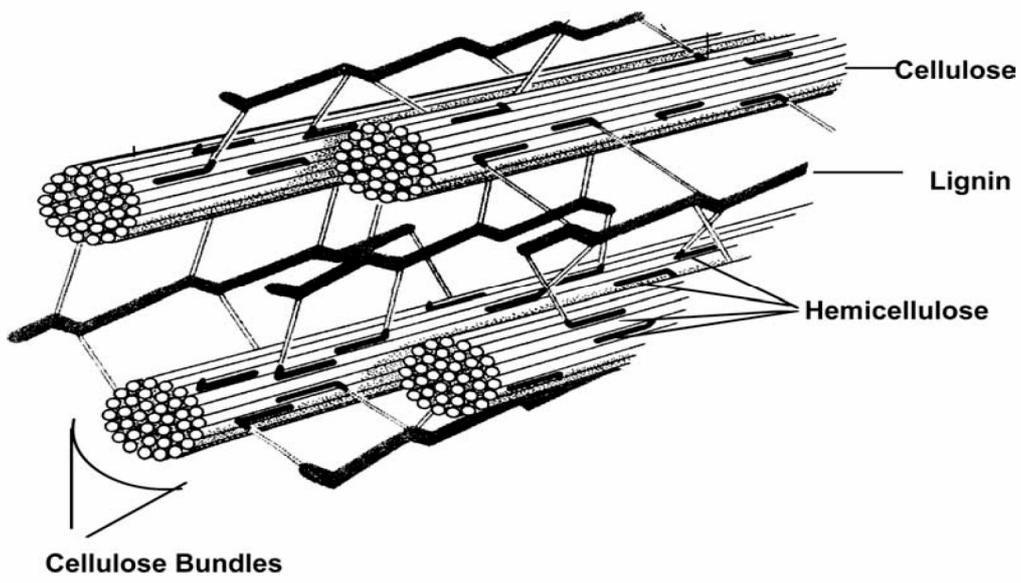


Fig. 2.2 Typical plant cell wall arrangement.

(Murphy and McCarthy, 2005 a)

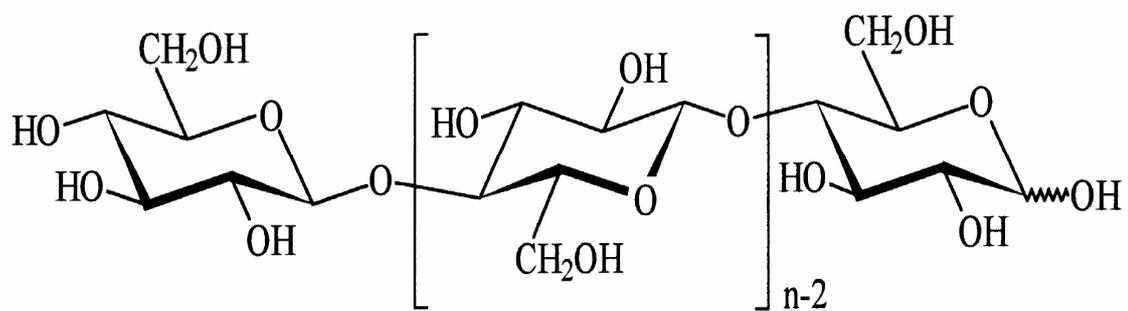


Fig. 2.3 The structure of cellulose, and that is consisted of D-glucose units.
(Askarieh *et al.*, 2000)

2.2.2 纖維素水解

纖維素不容易分解，需要以化學或生物方式水解成簡單的醣類，這些分子較小的醣類即可提供其它生物利用，水解方式包括化學與酵素或生物方式，化學方式包含酸水解、超臨界二氧化碳與濕氧化等方式，化學方式多以強酸或高溫高壓進行水解，且處理反應劑量與時間控制不易，容易過度分解成其它副產物或反應不完全 (Kim and Hong, 2001 ; Fox and Noike, 2004)。酵素及生物處理可以免除化學處理的缺點，利用添加纖維分解酵素 (cellulases) 或真菌、纖維素分解菌群將纖維水解成可溶解醣類 (Fig. 2.4) (Shoham *et al.*, 1999)，操作簡易更可降低操作管理的成本，且纖維素分解菌群本身具有纖維分解酵素，與直接添加酵素的成效相當，皆具有纖維素分解為醣類並同時發酵的功能，由纖維素分解後產生的醣類或酸類如葡萄糖、纖維雙醣、醋酸等，可加以運用成為生質能材料來源，對於環境是種友善兼具產能的方式 (Zeikus, 1979 ; Van Wyk, 2001)。

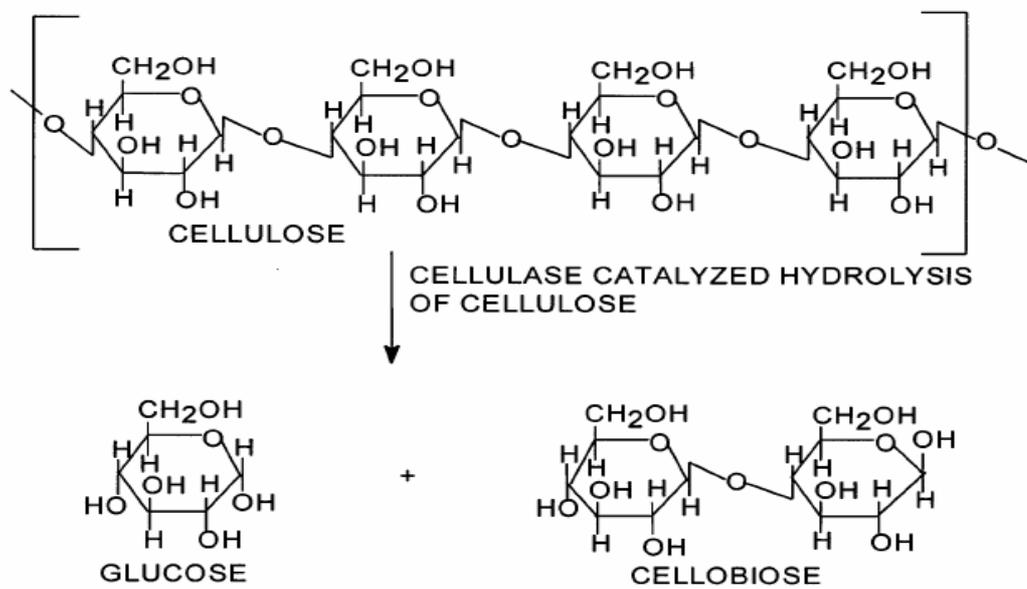


Fig. 2.4 Cellulase-catalyzed biodegradation of cellulose into reducing sugars, glucose, and cellobiose.

(Van Wyk, 2001)

2.2.3 纖維素水解酵素種類與系統

纖維素結構緊密，在纖維素降解系統中，依賴能水解纖維素的微生物及真菌將纖維轉化為醣類，提供其它生物或細胞能量來源，其中纖維素分解酵素係以配醣體水解酶 (glycoside hydrolase) 構成，主要功能為水解低級寡醣或多醣類 (oligosaccharides or polysaccharides)，可直接打斷纖維素鍵結 (β -1,4 glucosidic bonds)，而不同型態的纖維分解菌群具有不同的酵素分解功能，也因此使纖維素分解酵素 (cellulases) 呈現多樣化 (Bayer *et al.*, 1998 ; Schwarz, 2001 ; Jang and Chen, 2003)。微生物之纖維分解酵素依據不同的功能型態分為三大類 (Fig. 2.5)。

1. 內切型纖維素分解酵素 (endo- β -1,4-D-glucanase) (EC 3.2.1.4)，此酵素又稱 endoglucanases、carboxymethylcellulase (CMCase) 或 1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolases，可作用在纖維素的非結晶型 (amorphous sites) 結構上，利用非特異性 (random) 方式打斷 β -1,4 醣鍵，使纖維素分解成 glucose、cellobiose 與 cellodextrin 等水溶性衍生物，缺乏獨立分解結晶型纖維素的能力，需要配合外切型纖維素分解酵素共同作用，才能達到有效的分解結晶型纖維素

(Fig. 2.6 A)。

2. 外切型纖維素分解酵素(exo- β -1,4-D-glucanase) (EC 3.2.1.91)，此酵素稱為 β -1,4-glucan cellobiohydrolase、cellulose- β -1,4-glucan cellobiosidase 或 exocellobiohydrolase，可應用於結晶型纖維素 (microcrystalline cellulose)之分解，如微晶型棉花，依作用方式可分為 CBH I (從還原端作用)及 CBH II (從非還原端作用)，與內切型纖維素分解酵素協同作用下，對於結晶型纖維具有良好的水解纖維素效果 (Fig. 2.6 A)。
3. β -葡萄糖酵素 (β -1,4- glucosidase) (EC 3.2.1.21)，又可稱為 cellobiase 或 β -1,4-glucohydrolases，自非還原端起以葡萄糖作為一個單位，進行水解，將纖維雙糖及纖維糊精(cellodextrins)分解為葡萄糖 (Bhat and Bhat, 1997；Lynd *et al.*, 2002)。

纖維素分解菌群藉由此三種類型的酵素共同作用，構成一個複合的纖維素酵素系統如 Fig. 2.6 B。

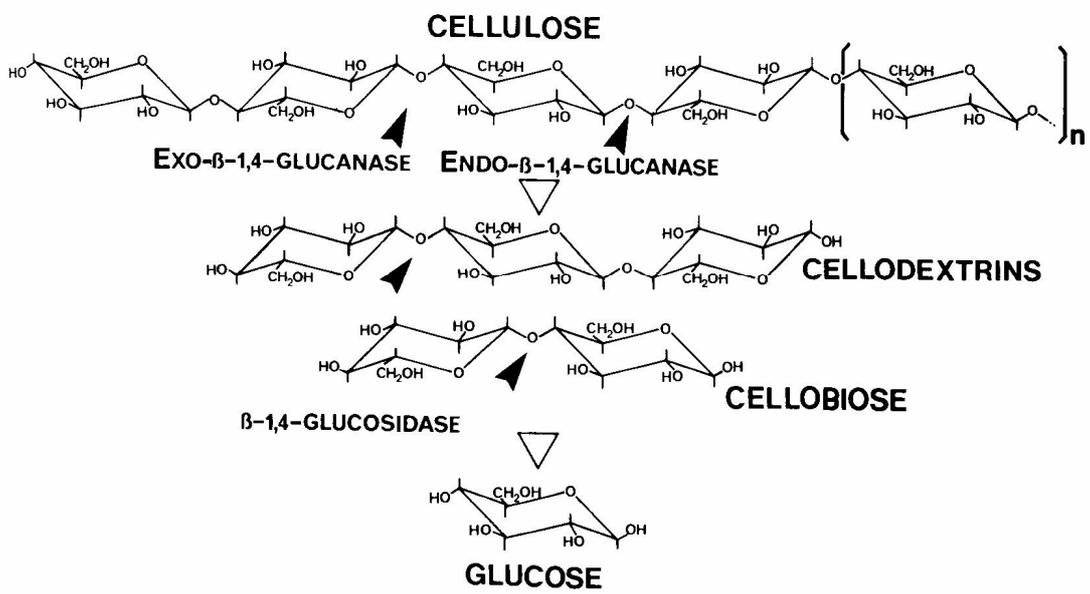


Fig. 2.5 Enzymes involved in hydrolysis of cellulose.

(Winkelmann *et al.*,1992)

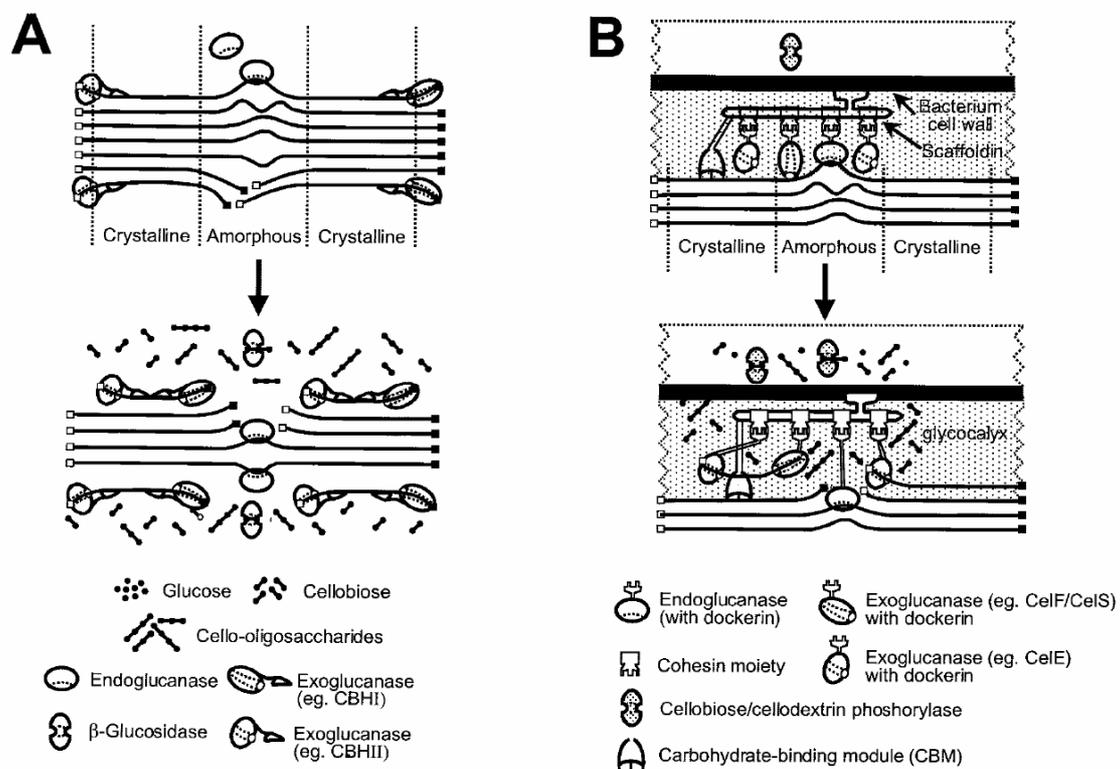


Fig. 2.6 Schematic representation of the hydrolysis of amorphous and microcrystalline cellulose by noncomplexed (A) and complexed (B) cellulose systems. The solid squares represent reducing ends, and the open squares represent nonreducing ends. Amorphous and crystalline regions are indicated. Cellulose, enzymes, and hydrolytic products are not shown to scale.

(Lynd *et al.*, 2002)

2.2.4 纖維素水解酵素之應用

一般的酵素來自於中溫菌且本身不具有耐熱性，容易受環境溫度影響，導致本身性質改變，失去原有的活性與功能。近年來為改善此類問題，已有許多相關嗜熱性微生物與其本身具有的熱穩定酵素研究，此類耐熱酵素可應用度高。酵素的使用以工業應用佔多數，主要應用在紙漿、造紙工業 (pulping industry)、紡織 (textile)、食品加工及污染防治等。

在食品加工上可改善食品口感，移除原料中的纖維素，纖維素醱化後之產物可作為醱酵碳源。另外在紡織工業裡，cellulases更被大量使用在棉花產品上，去除絨毛並促進織品材質的光亮度，但此過程需以最低為70°C或更高溫的蒸汽處理以除去澱粉，而一般酵素無法承受此高溫，因而使嗜熱菌群的研究更加廣泛，其耐高溫之纖維素分解酵素可增加棉質衣物的柔軟度 (Beguin, 1992; Coughlan, 1985; Ando *et al.*, 2002; 尤氏, 2003; Jang and Chen, 2003)。

在回收紙工業的製程上因纖維再循環率高，導致回收紙類本身的纖維有短化的現象或本身性質的改變，且這些回收紙類來源複雜，通常都帶有其它附加的污染物質，再配合機械、化學或攪拌製漿方式，對於造紙品質會有負面影響，且難以維持紙類的生產品質。因此，在

過去幾十年的造紙工業就已開始發展cellulases在造紙上的應用方式，因外切型纖維分解酵素具有不改變纖維張力的特性，可被使用作為表面修飾與處理，增進再生漿的使用效率，提升纖維的彈性強度與結合度，更可以改善這類工業廢水的污染程度 (Dienes *et al.*, 2006 ; Zeikus, 1979)。

2.3 纖維素生物轉化 (Bioconversion of cellulose)

纖維質廢棄物在地球上的分布廣泛且含量居高，包括森林活動、農業產生的稻稈、甘蔗渣、玉米、菜葉果皮殘渣、廚餘、都市固體廢棄物及廢棄紙類等，可作為生物產物的再生資源 (bioproducts)，物化的方式除了耗能且有二次污染之餘，因此，許多研究致力於以生物的方式將廢棄紙類或纖維質轉換為可再利用的能源，包含好氧與厭氧性的生物轉化，如甲烷、氫能、乙醇或甲醇，除了達到廢棄物減量並提升生物資源 (Biowaste)的利用性，更具有永續發展的潛能。

在厭氧培養的狀態下，當纖維素被纖維素分解菌群分解利用 (Fig. 2.7)，會形成纖維雙糖、葡萄糖、纖維糊精等結構簡單的醣類，這些具有水解纖維素能力的菌群因特徵型態不同，而使醣化產物呈現

多樣化，此階段即為水解反應，產生的醣類物質便很容易被醱酵菌群或纖維水解菌群再分解利用，經轉化而生成 CO_2 、 H_2 或揮發性脂肪酸類，醣類轉化為 CO_2 、 H_2 或有機酸類的過程稱為酸化作用，酸化產生之揮發性有機酸類包括甲酸鹽、乙酸鹽、丙酸鹽、丁酸鹽等酸類物質，在此主要可分成四個途徑生成甲烷，首先是甲烷生成菌群由醱酵生成之 CO_2 、 H_2 直接利用生成甲烷；或由丙酸鹽、丁酸鹽經共營菌群轉換成 CO_2 、 H_2 及乙酸鹽；或由甲酸鹽、乙酸鹽直接被甲烷菌群利用，而部份的 CO_2 、 H_2 則可被醋酸生成菌還原為醋酸，這四種途徑之代謝產物如甲酸鹽、乙酸鹽、 CO_2 、 H_2 皆可提供甲烷菌群生長碳源。

在纖維素生物轉化過程中，揮發性脂肪酸類容易使 pH 值下降，且當其累積過高濃度時，則呈現酸性，而過酸的環境不利於微生物生長，亦會抑制甲烷生成，因此要達到有效的轉化有機質並維持適合甲烷生成的環境，需針對生長溫度、pH 值、基質添加濃度與來源、輔助因子、鹼度等影響因子探討。因反應溫度、pH 值、輔助因子會影響微生物生長與活性，且反應過程中，過量的基質添加對於微生物負荷太高，造成過高的酸物質累積而抑制生長，而大部份學者為因應酸化問題，以添加鹼度的方式，增加緩衝範圍提高有機質分解與甲烷生

成率，或是將反應分成酸化與甲烷化兩階段槽體，使反應趨於穩定化
(Leschine, 1995)。

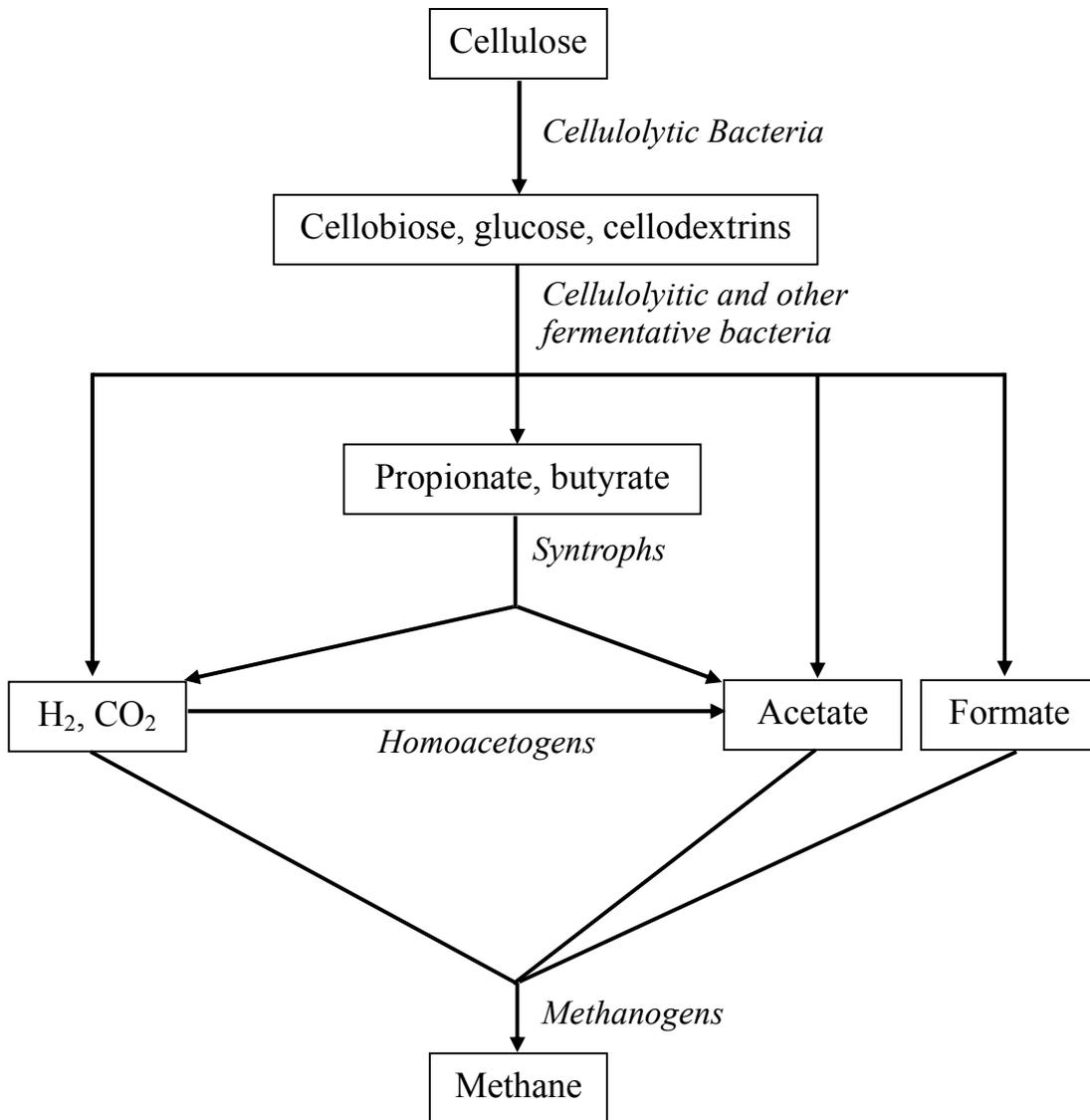


Fig. 2.7 Diagram of anaerobic biodegradation of cellulose to methane by microbial communities in soils and freshwater sediments.

(Leschine, 1995)

2.4 嗜熱性厭氧細菌 (Anaerobic Thermophilic Bacteria)

溫度是影響微生物生長的主因，主要是因為微生物本身所含之蛋白質活性有關，在1969年，Thomas Brock在美國黃石公園熱泉中分離純化出*Thermus aquaticus* (Zeikus *et al.*, 1969)，為第一株嗜熱菌，引起許多科學家致力於嗜熱性菌的研究，發現嗜熱菌之細胞組成及其酵素能夠忍受高溫的環境，並進行蛋白質合成，在高溫下生長而仍然可以維持酵素活性，且在高溫環境下此嗜熱菌才可發揮熱穩定酵素的功用，而不具有耐熱酵素之菌群在高溫下，則酵素變性而失去應有之活性。

嗜熱菌的分佈廣泛，在溫泉、火山口、堆肥、牛胃中或經陽光長期照射而溫度較高的土壤或湖泊底泥可分離出嗜熱菌群 (王氏，2006；蔡氏，2000；黃氏，2000；Huang *et al.*, 1998)，其中包括嗜熱甲烷菌與纖維素分解菌 (Table 2.2)。

此類嗜熱菌可應用在堆肥發酵 (蔡氏等，1991)或是在生物科技上的發展，適當的堆肥發酵，其內部溫度最高可達60°C以上，而大部分的病原菌、蟲卵在高溫下可被殺滅；另外嗜熱菌因具有熱穩定酵素而被發展為耐熱性甚高的*Taq* DNA polymerase，廣泛地應用在分子生物技術中作為聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)之

聚合酵素；或是嗜熱性菌群在纖維質廢棄物的處理與生質能上的運用，對於工業界及生物科技上之運用具有極高潛能 (Zeikus, 1979；Haki and Rakshit, 2003)。

Table 2.2 Thermophilic methanogen and anaerobic cellulolytic microorganism.

	Genus	Species	
Methanogen	<i>Methanothermobacter</i>	<i>thermautotropicus</i>	
		<i>marburgensis</i>	
		<i>thermoflexum</i>	
		<i>wolfeii</i>	
		<i>thermophilum</i>	
	<i>Methanothermus</i>	<i>defluvii</i>	
		<i>fervidus</i>	
	<i>Methanothermococcus</i>	<i>sociabilis</i>	
		<i>thermolithotrophus</i>	
	<i>Methanocaldococcus</i>	<i>jannaschii</i>	
		<i>fervens</i>	
	Anaerobic cellulolytic microorganism	<i>Methanotorris</i>	<i>infernus</i>
			<i>vulcanius</i>
		<i>Methanoculleus</i>	<i>igneus</i>
			<i>thermophilicus</i>
<i>Methanosarcina</i>		<i>thermophila</i>	
<i>Methanosaeta</i>		<i>thermophila</i>	
<i>Methanomethylovorans</i>		<i>thermophila</i>	
<i>Methanotherix</i>		<i>thermoacetophile</i>	
<i>Methanopyrus</i>		<i>kandleri</i>	
<i>Acetivibrio</i>		<i>cellulolyticus</i>	
	<i>Bacteroides</i>	<i>cellulosolvens</i>	
	<i>Bacteroide</i>	<i>succinogenes</i>	
	<i>Ruminococcus</i>	<i>albus</i>	
	<i>Ruminococcus</i>	<i>flavefaciens</i>	

(Jiang *et. al.*, 2005; Boone, 2001; Kristjansson and Stetter, 1991 ; Bhat and Bhat, 1997)

2.5 生物甲烷 (Biogas)燃料與應用

生物甲烷又可稱為沼氣，具可燃性，逸散在空氣中則易燃。目前生物甲烷大都來自於厭氧轉化有機質及都市廢棄物，除了減少污染還可提供再生能源 (Yang *et al.*, 2004 ; Leschine., 1995)，其中以嗜熱性之纖維分解與甲烷生成菌群具有較高的處理速率與轉換率 (Ozturk, 1991)。甲烷生成是有機物質被降解的最終階段，表示厭氧微生物 (包括甲烷菌)反應完全才可進行至最終步驟。一般甲烷化常發生於反芻動物的消化系統中 (VaÂradyovaÂ *et al.*, 2000)，在掩埋、消化槽、底泥、沼澤或堆肥場亦常有沼氣生成，但卻未有完善的收集設備。若可將甲烷氣體回收作為燃料使用，可以節省在掩埋場沼氣及臭味處理的管理經費，營造乾淨的綠色環境，並有效減少溫室效應氣體中，甲烷及二氧化碳的排放量，因此回收的沼氣可用於替代燃料、發電等，是一種能夠符合環保再生之綠色能源 (Murphy and McCarthy, 2005 b ; 張氏，2000)。

2.6 厭氧生物處理之影響因子

2.6.1 溫度

生物隨著本身的蛋白質特性不同而生長溫度不同，因此呈現多樣性，培養溫度會影響微生物本身蛋白質活性，不當的溫度會造成其蛋白質性質改變而失去原有的功能及活性，導致新陳代謝速度降低，因此，培養溫度會影響微生物對於基質的利用性與速率，而依微生物生長溫度分為三類，嗜高溫菌 (thermophilies)、嗜中溫菌 (mesophiles) 及嗜冷菌 (psychrotrophs)，嗜高溫菌泛指可生長在45°C以上之微生物，此類型微生物在高溫之下生長情形佳，嗜中溫菌為適於生長在20~45°C之微生物；而嗜冷菌為生長溫度小於20°C之微生物 (Haki and Rakshit, 2003; Itoh, 2003; Niehaus *et. al.*, 1999)。

2.6.2 pH值

菌群生長環境之酸鹼度會影響或限制其生長速率，過酸或過鹼皆會容易對微生物生長產生抑制作用，依pH值範圍分成三種類型，嗜酸性 (Acidophiles) 菌群最適生長在pH 1~5.5之間，嗜中性 (Neutrophiles) 則為pH 5.5~8.0之間；而嗜鹼性 (Alkalophiles) 為pH 8.5~11.5之間 (Mosier *et al.*, 2005 ; Hu *et al.*, 2004)。

2.6.3 碳源濃度

碳源係為微生物生長主要來源，適當的碳源培養濃度可以增進微生物生長。添加少量碳源時，容易因碳源不足而限制微生物生長，但濃度過高的碳源會增加生物的有機負荷，及代謝產物的累積，抑制菌群導致生長速度受影響。

2.6.4 輔因子

以酵母菌萃取物 (yeast extract)與水解蛋白質 (peptone)為輔助因子，是許多種微生物生長所需要之輔助物質，可提供菌群碳源以外之營養來源，輔助微生物生長。yeast extract係由amino acids, peptides, vitamins, 包括pyruvic, glyceric acid等有機酸所構成，提供脂溶性、水溶性物質；peptone含有複雜的胺基酸成份。yeast extract與peptone可被微生物利用，進而形成細胞生長之營養因子，因此，添加適當的濃度可促進細胞生長，促進菌群對基質利用率與產物生成率，因過低時會對微生物有限制生長的情形，過高則會造成抑制作用，因此，適當濃度的添加可刺激微生物生長 (Arasaratnam *et al.*, 1996)。

2.6.5 鹼度 (Alkalinity)

厭氧消化反應包括水解 (hydrolysis)、酸化 (acidogenesis)及甲烷化 (methanogenesis)，以水解作用將纖維素為醣類後，醣類經過醱酵後生成揮發性脂肪酸 (volatile fatty acids, VFAs)，若在反應過程中產生高濃度揮發性脂肪酸，使酸化累積而導致pH值下降，則會抑制水解作用與甲烷化，使纖維分解率降低，且酸性環境下不利於甲烷生成。近來學者提出添加碳酸氫鈉提高鹼度的方式，可減緩酸化速度，並改善因揮發酸累積而降低pH值的情況，提高甲烷生成率 (Mockaitis *et al.*, 2006；Siegert and Banks, 2005)。