

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

以反應曲面法探討水解纖維素產氫醱酵程序最適化之研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 99-2221-E-029-027-
執行期間：99年08月01日至100年07月31日
執行單位：東海大學環境科學與工程學系

計畫主持人：黃啟裕

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：何志鴻
碩士班研究生-兼任助理人員：曾昱智

公開資訊：本計畫可公開查詢

中華民國 101 年 02 月 21 日

中文摘要：氫氣具有相當高的熱值且燃燒後之產物只有水，並不會造成環境的污染，因此為一種潔淨能源。在眾多產氫方法中，以生物作用產生氫氣為對環境友善之產氫程序，且與化學程序相比其所消耗的能源亦較少。纖維素大量存於地球的植物以及各式農業廢棄物中，來源多及廣，但不易在常溫下被微生物分解，做為生物產氫的基質。在高溫的環境下可加快消化速度，有助於纖維素的水解，在生物產氫過程中，纖維素的水解反應為速率決定步驟，因此在高溫狀態下進行纖維素之水解，為一種有效率的生物產氫方法。在本研究利用由牛糞微生物群篩選出之纖維水解菌株 *Clostridium thermocellum* strain TCW1，先前之研究發現此菌株可降解纖維素產生乙酸、氫氣及二氧化碳。在本研究中，以 α -cellulose 為碳源進行震盪批次培養，藉由反應曲面法(Response surface methodology, RSM)探討在初始 pH、溫度與基質濃度三個變因下之最佳產氫培養條件。經由實驗結果得知，strain TCW1 在初始 pH 6.90、溫度 57.50C 及 α -cellulose 濃度為 7.7g/L 時，有最大的氫氣產率為 104.34 mL H₂/g cellulose；而在產氫速率的最佳培養條件則為初始 pH 6.90、溫度 630C 及 α -cellulose 濃度為 9.3g/L，其最大產氫速率為 13.66 mL H₂/L·r，並由實驗結果得知反應曲面法有助於醱酵產氫程序之最佳化。

中文關鍵詞：Clostridium、氫氣、暗醱酵、反應曲面法

英文摘要：Hydrogen is a clean energy source due to its high energy content per unit mass and its harmless combustion end-product water. Biological hydrogen production processes are found to be more environment friendly and less energy intensive as compared to thermochemical and electrochemical processes. Cellulose is the most common organic compound on Earth found in plant and agricultural wastes. Cellulose is hard to be decomposed by microorganisms in ordinary temperatures, so as not to be the substrate for biological hydrogen production. Thermophilic hydrolysis of cellulose is usually advantageous since the digestion in rate increases high temperatures. Cellulose hydrolysis is the rate-limiting step during cellulosic biohydrogen production, therefore hydrolysis of cellulosic materials at high temperatures using thermophilic microorganism seems to be an effective cellulose

pretreatment process. *Clostridium thermocellum* strain TCW1 was isolated from cow manure and was found to be able to degrade cellulose, and produced acetate, hydrogen and carbon dioxide. The purpose of this study was to find the effect of initial pH, temperature and cellulose concentration on the growth of *Clostridium thermocellum* strain TCW1 in batch culture and to optimize the fermentative hydrogen production process by response surface methodology (RSM). The results indicated the highest hydrogen yield of 104.34mL H₂/g cellulose was occurred at the initial pH of 6.90, the temperature at 57.50C and the α -cellulose concentration of 7.7g/L. The optimal hydrogen production rate of 13.66mL H₂/L · r was occurred at the initial pH of 6.90, temperature at 630C and the α -cellulose concentration of 9.3g/L. The experiment results showed that the response surface methodology was useful for optimizing the fermentative hydrogen production process

英文關鍵詞： *Clostridium*； hydrogen； dark fermentation； response surface methodology

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

以反應曲面法探討水解纖維素產氫醱酵程序最適化之研究
研究成果報告(精簡版)

計畫類型：一般型研究計畫(個別型)

計畫編號：NSC 99-2221-E-029-027

執行期間：99 年 08 月 01 日至 100 年 07 月 31 日

執行單位：東海大學環境科學與工程學系

計畫主持人：黃啟裕

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：何志鴻

碩士班研究生-兼任助理人員：曾昱智

中華民國 100 年 11 月

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以反應曲面法探討水解纖維素產氫醱酵程序最適化之研究

Application of response surface methodology (RSM) to investigate the optimal operation conditions of fermentative hydrogen production from cellulose hydrolysis

計畫編號: NSC 99-2221-E-029-027

執行期限: 99 年 08 月 01 日至 100 年 07 月 31 日

主持人: 黃啟裕 助理教授 東海大學環境科學與工程學系

計畫參與人員: 何志鴻和曾昱智 東海大學環境科學與工程學系

一、中文摘要

氫氣具有相當高的熱值且燃燒後之產物只有水，並不會造成環境的污染，因此為一種潔淨能源。在眾多產氫方法中，以生物作用產生氫氣為對環境友善之產氫程序，且與化學程序相比其所消耗的能源亦較少。纖維素大量存於地球的植物以及各式農業廢棄物中，來源多及廣，但不易在常溫下被微生物分解，做為生物產氫的基質。在高溫的環境下可加快消化速度，有助於纖維素的水解，在生物產氫過程中，纖維素的水解反應為速率決定步驟，因此在高溫狀態下進行纖維素之水解，為一種有效率的生物產氫方法。在本研究利用由牛糞微生物群篩選出之纖維水解菌株 *Clostridium thermocellum* strain TCW1，先前之研究發現此菌株可降解纖維素產生乙酸、氫氣及二氧化碳。在本研究中，以 α -cellulose 為碳源進行震盪批次培養，藉由反應曲面法(Response surface methodology, RSM)探討在初始 pH、溫度與基質濃度三個變因下之最佳產氫培養條件。經由實驗結果得知，strain TCW1 在初始 pH 6.90、溫度 57.5°C 及 α -cellulose 濃度為 7.7g/L 時，有最大的氫氣產率為 104.34 mL H₂/g cellulose；而在產氫速率的最佳培養條件則為初始 pH 6.90、溫度 63°C 及 α -cellulose 濃度為 9.3g/L，其最大產氫速率為 13.66 mL H₂/L·hr，並由實驗結果得知反應曲面法有助於醱酵產氫程序之最佳化。

關鍵詞：*Clostridium*、氫氣、暗醱酵、反應曲面法

Abstract

Hydrogen is a clean energy source due to its high energy content per unit mass and its harmless combustion end-product water. Biological hydrogen production processes are found to be more environment friendly and less energy intensive as compared to thermochemical and electrochemical processes. Cellulose is the most common organic compound on Earth found in plant and agricultural wastes. Cellulose is hard to be decomposed by microorganisms in ordinary temperatures, so as not to be the substrate for biological hydrogen production. Thermophilic hydrolysis of cellulose is usually advantageous since the digestion in rate increases high temperatures. Cellulose hydrolysis is the rate-limiting step during cellulosic biohydrogen production, therefore hydrolysis of cellulosic materials at high temperatures using thermophilic microorganism seems to be an effective cellulose pretreatment process. *Clostridium thermocellum* strain TCW1 was isolated from cow manure and was found to be able to degrade cellulose, and produced acetate, hydrogen and carbon dioxide. The purpose of this study was to find the effect of initial pH, temperature and cellulose concentration on the growth of *Clostridium thermocellum* strain TCW1 in batch culture and to optimize the fermentative hydrogen production process by response surface methodology (RSM). The results indicated the highest hydrogen yield of 104.34mL H₂/g cellulose was occurred at the initial pH of 6.90, the temperature at 57.5°C and the α -cellulose concentration of 7.7g/L. The optimal hydrogen production rate of 13.66mL

H₂/L·hr was occurred at the initial pH of 6.90, temperature at 63°C and the α-cellulose concentration of 9.3g/L. The experiment results showed that the response surface methodology was useful for optimizing the fermentative hydrogen production process.

Keywords: *Clostridium*, Hydrogen, Dark fermentation, Response surface methodology

二、緣由與目的

21 世紀的今天，人類面臨了「能源危機」與「氣候變遷」兩大課題。自工業革命以來，隨著時代進步與科技發展，造就人類優渥及便利的生活；相對的，這也造成對石化燃料(Fossil fuel)的需求及依賴性日益增加，似乎在工業快速進步的現今社會造成不小的衝擊。原因之一在於石化燃料(如：石油、天然氣、煤炭等)在燃燒時，會排放二氧化碳、一氧化碳、氮氧化物等汙染物質，不但造成空氣汙染，同時也會使得氣候變遷的問題日益嚴重。另一原因則為，石化燃料為無法再生之能源，終會有耗竭的時候。若人類再不正視能源短缺的問題，將會引發能源危機。因此，為了解決能源及氣候變遷的問題，勢必開發可再生且對環境友善的非傳統能源[1]。以台灣來說，土地面積不大，自然資源較為貧瘠，且屬於海島型國家，大部分的能源主要仰賴進口，因此，更需要積極的開發新的替代能源，如太陽能、水力、風力、生質能、地熱能及潮汐能[2]。

生質能依行政院經濟部能源局所訂定之「再生能源發展條例」行政院其定義為：國內農林植物、沼氣及國內有機廢棄物直接利用或經處理所產生的能源。因此生質能扮演相當重要的角色，因其可經由廢棄物轉化而取得能源，不但可以替代石化燃料，同時也可達到廢棄物減量的目的[3]。台灣早期為農業社會，但隨著工商業的發展，使得台灣的社會發展型態由農業社會轉變成為工商業社會，儘管如此，在台灣每年還是產生一千兩百萬噸的農業廢棄物。在這些數量龐大的農業廢棄物中，都具有一個共同的特點為含有大量的纖維素(Cellulose)，約佔整體的 35~50%，因此提

供了一個很好的料源來產生生質能源。眾多替代能源中，氫能為較受矚目的再生能源。氫氣為一種潔淨且可再生的能源，具有很高的熱值，約有 142 MJ/kg，因此被認為是未來可替代石化燃料的可再生能源[4]。依行政院經濟部之「再生能源發展條例」中，氫能是指以再生能源為能量來源，分解水之氫氣，或利用細菌、藻類等生物之分解或醱酵作用所產生之氫氣，作為能源用途者。在產氫的方法中，利用生物醱酵，光合細菌或藻類光合作用是一種環保，且節能的產氫程序[5]。反觀，若利用化學程序產氫的過程，例如：蒸氣重組法(Steam reforming)、煤氣化法(Coal gasification)、部分氧化法(Partial oxidation)或電解法(Electrolysis)等化學產氫程序卻會消耗大量的石化燃料[6]因此對能源供應及環境永續並無助益，因此生物產氫法為對環境最友善的產氫方法。

本研究係利用前人研究由牛糞中所分離出的一株纖維水解產氫菌，並已經過鑑定之 *Clostridium thermocellum* strain TCW1，該菌株可將 5g/L 的纖維素在三天內完全水解並直接產生氫氣。因此本研究以影響微生物生長最主要因子生長溫度、酸檢 pH 值及基質濃度為探討條件，利用反應曲面法(response surface methodology, RSM)，探討 strain TCW1 利用纖維素進行醱酵產氫最佳化培養條件，以取得最佳的產氫效能。

三、結果與討論

1. 氫氣產率之最適培養條件

由表 1 中利用 RSM 實驗設計所得到之氫氣產率(H₂ yield)最適培養條件如圖 1~3 所示。由此實驗設計方法所得到之最佳培養條件為 pH 6.90、溫度 57.5°C 及 α-cellulose 濃度 7.7g/L。而預測之最高氫氣產率為 95.05 mL H₂/g cellulose，經由統計分析所得到之 p 值如表 1 所示。其迴歸方程式如下：

$$\begin{aligned} \text{H}_2 \text{ yield (mL H}_2\text{/g cellulose)} = & -2696.2 + 514.41X_1 + 36.59X_2 - 4.93X_3 - \\ & 38.85 X_1^2 - 0.32 X_2^2 - 0.43 X_3^2 + 0.02 X_1 X_2 + 1.26 X_1 X_3 + 0.05 X_2 X_3 \\ & (R^2=0.928) \end{aligned}$$

(X₁: initial pH; X₂: temperature; X₃:

substrate concentration)

2. 產氫速率之最適培養條件

由表 1 中以 RSM 實驗設計法得到之產氫速率(H_2 production rate)最適培養條件如圖 4~6 所示。經由此實驗設計方法得到之最適培養條件為 pH 6.90、溫度 $63^\circ C$ 及 α -cellulose 濃度 9.3g/L。而所預測到之最大產氫速率為 10.01 mL $H_2/L \cdot hr$ ，經由統計分析所得到之 p 值如表 1 所示。其迴歸方程式如下：

$$H_2 \text{ production rate (mL } H_2/L \cdot \text{hr)} = -351.6 + 60.57 X_1 + 4.87 X_2 + 1.49 X_3 - 3.89 X_1^2 - 0.03 X_2^2 - 0.07 X_3^2 - 0.16 X_1 X_2 + 0.15 X_1 X_3 - 0.02 X_2 X_3 \quad (R^2=0.897)$$

(X_1 : initial pH; X_2 : temperature; X_3 : substrate concentration)

3. RSM 實驗設計之結果驗證

本實驗對產氫率(H_2 yield)及產氫速率(H_2 production rate)中以 RSM 實驗設計方法，所得到之最佳培養條件進行實驗之驗證。其實驗結果如表 2 所示，在本實驗中得到之產氫率及產氫速率之結果皆與 RSM 所預測出之結果相差不大，因此可證實利用 RSM 實驗設計所得之結果準確性。

四、結論

本實驗中以 pH 6~8、溫度 $50 \sim 65^\circ C$ 及基質濃度 5~15g/L 進行中心混成實驗，包含 8 個二水準法所產生之實驗組別與 6 個星點加上 6 個中心點共 20 組實驗。經由中心混成實驗結果得知，strain TCW1 在起始 pH 過高或過低的培養條件下進行實驗時，較不利於菌體之生長而使得還原糖產量及纖維水解效率均受到影響，且在產氫量的部分雖皆有生物氫體的產生，但產氫速率受到 pH 之影響無法作用，而導致無法產生氫氣的現象。

經由 RSM 實驗設計之實驗結果，利用 Minitab 軟體進行分析並進行曲面圖及等高線圖之繪製後，得到最佳產氫率及產氫速率培養條件：產氫率最優條件為 pH 6.90、溫度 $57.5^\circ C$ 及基質濃度 7.7g/L；而產氫速率最佳條件為 pH 6.90、溫度 $63^\circ C$

及基質濃度 9.3g/L。並經由 RSM 預測之最大產氫率及產氫速率分別為 95.05 mL H_2/g cellulose 及 10.01 mL $H_2/L \cdot hr$ 。

在產氫率最優培養條件之實驗結果中，菌體之比生長速率為 $0.1267 hr^{-1}$ ，還原糖最高濃度為 893.9mg/L，且還原糖產生速率為 22.75mg/L·hr，纖維素降解情形由起始之 7.7g/L 至實驗結束後，共降解約 6.9g 之纖維素(約 89.9%)，以降解速率來看則為 0.096g/L·hr。在產氫量方面 strain TCW1 在此培養條件下所累積之生物氫體高達 2500mL/L，最大產氫率為 25.5%。而在此實驗中欲探討之產氫率為 104.34mL H_2/g cellulose，與 RSM 實驗設計所預測之值相差不大。

產氫速率最優培養條件之實驗結果中，菌體比生長速率為 $0.2303 hr^{-1}$ ，還原糖最高累積濃度為 928.9mg/L，其產生速率為 44.26mg/L·hr，基質水解效率方面，此最優實驗條件中所添加之纖維素含量為 9.3g/L，至實驗 72 小時後 strain TCW1 降解約 96% 之纖維素(約為 8.9g)，以降解速率來看則為 0.1241g/L·hr。在產氫量方面 strain TCW1 培養於此條件下所產生之累積生物氫體產量高達 3010mL/L，最大產氫率為 32.9%。而在此實驗中欲探討之產氫速率為 13.66mL $H_2/L \cdot hr$ ，亦與 RSM 實驗設計所預測之值相差不大。

五、參考文獻

- [1] Wang, J. and Wan, W. (2008). Optimization of fermentative hydrogen production process by response surface methodology. *International journal of hydrogen energy*, 33:6976-6984.
- [2] 王馨儀。(2005)。以牛糞中嗜熱厭氧菌群分解纖維素產乙醇之研究，東海大學環境科學與工程學系碩士論文。
- [3] 行政院經濟部。(2009)。再生能源發展條例。
- [4] Kapdan, L. K. and Kaegi, F. (2006) Biohydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 569-582.
- [5] Mu, Y., Zheng, X.J., Yu, H.Q., Zhu, R.F. (2006). Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31:780-785.
- [6] Das, D. and Veziroğlu, T.N. (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 25:13-28.

圖附件：

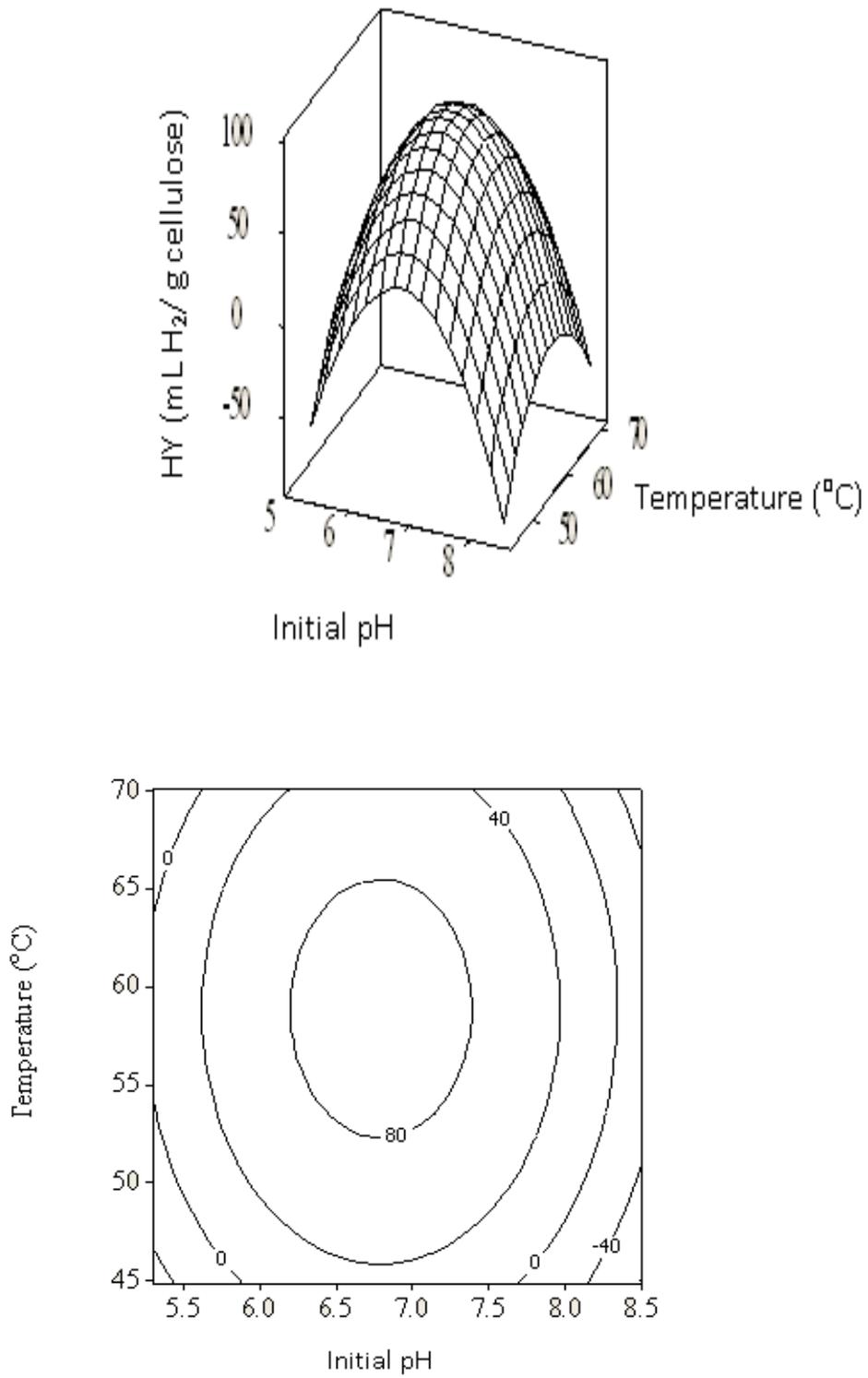


圖 1 初始 pH 與溫度 vs 氫氣產率之曲面圖與等高線圖。

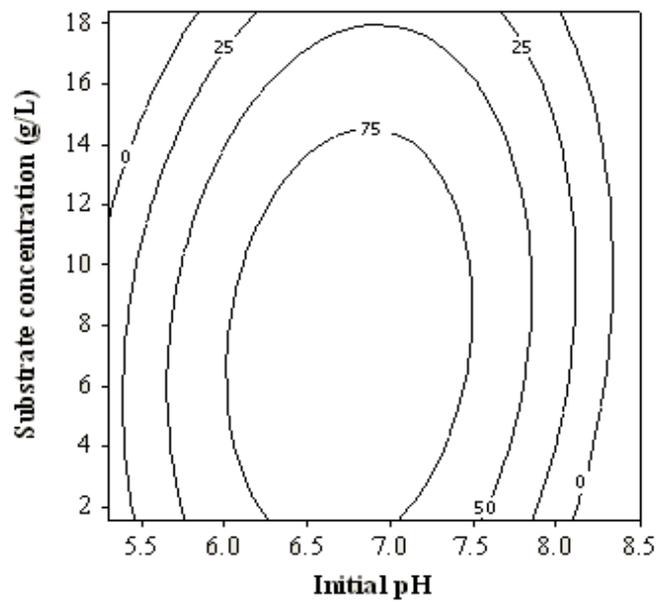
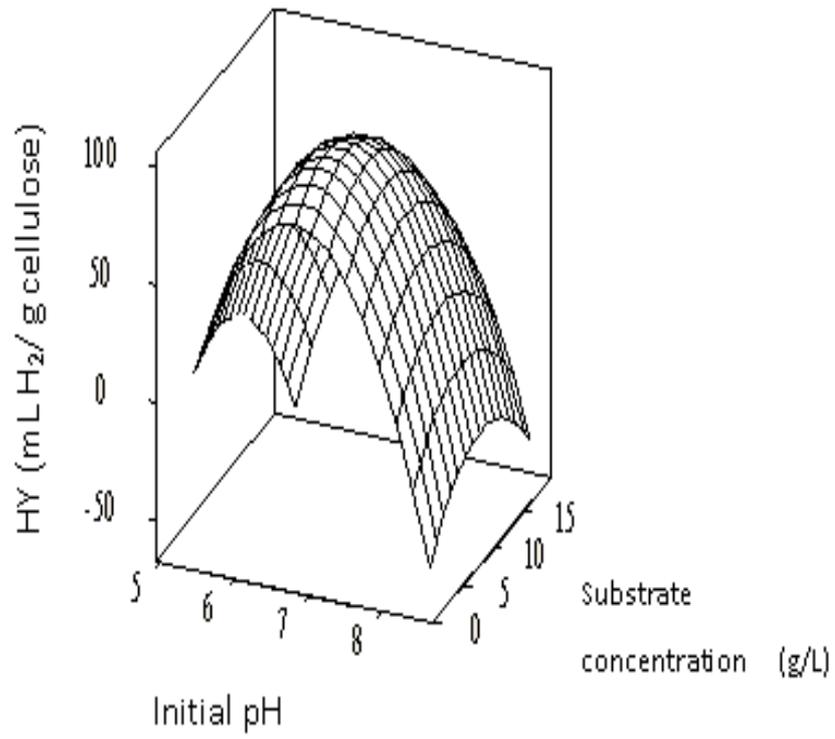


圖 2 初始 pH 與基質濃度 vs 氫氣產率之曲面圖與等高線圖。

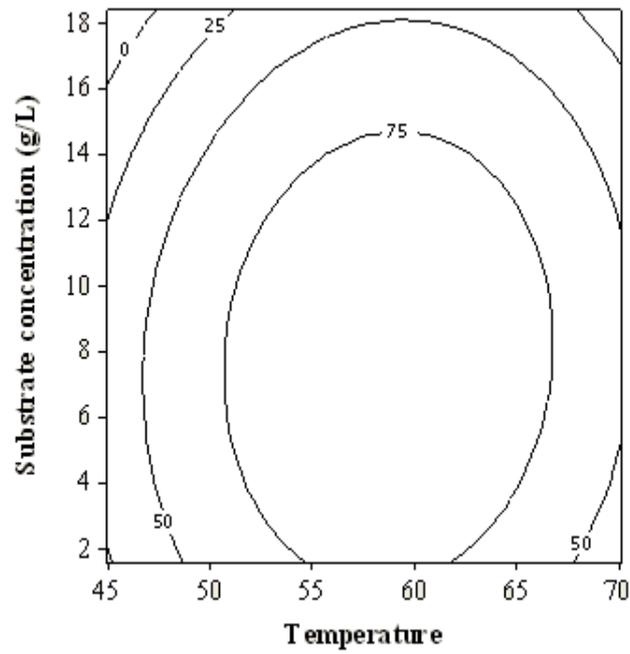
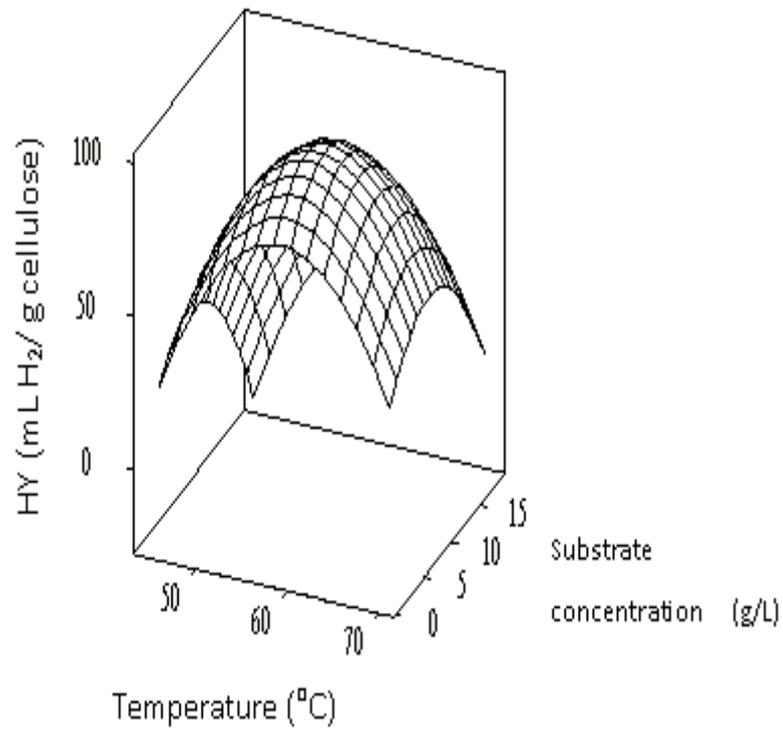


圖 3 溫度與基質濃度 vs 氫氣產率之曲面圖與等高線圖。

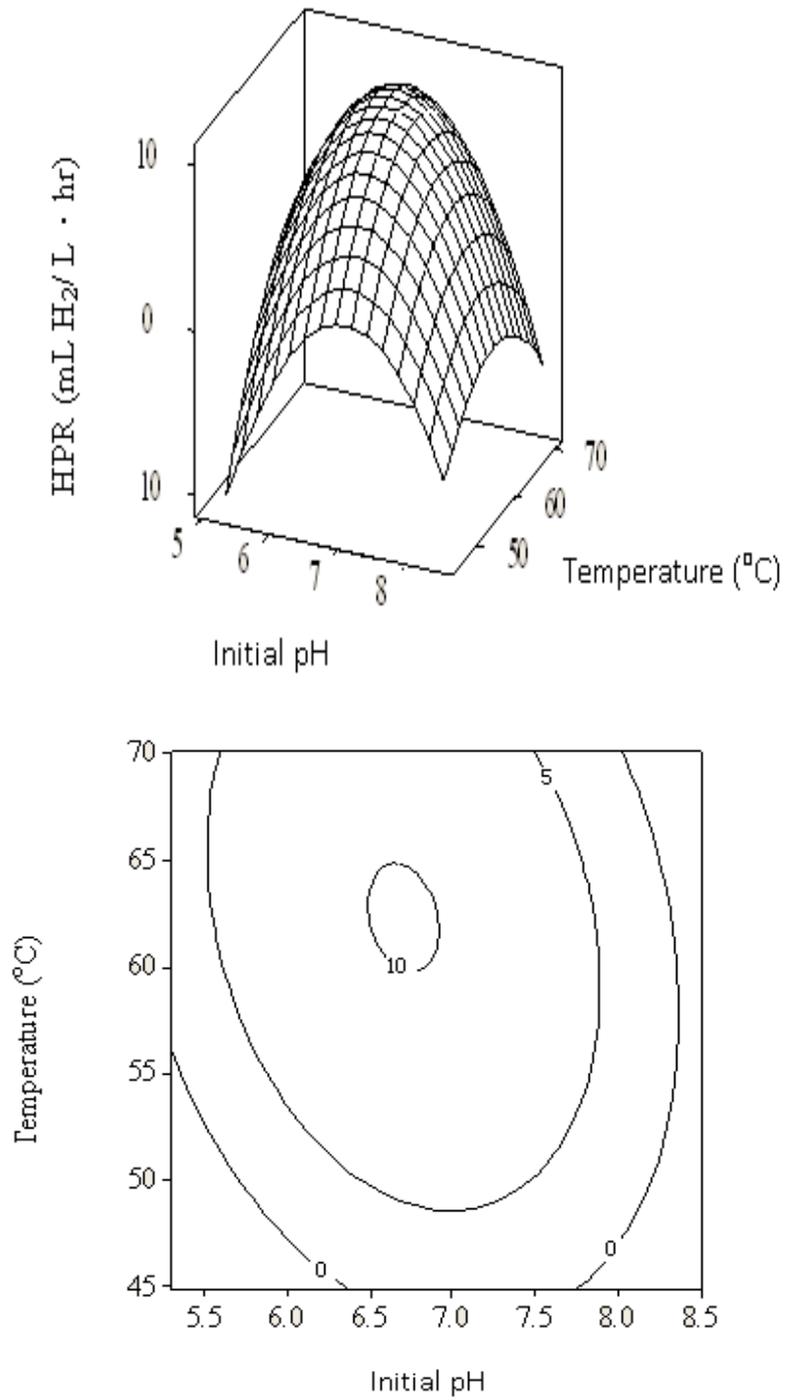


圖 4 初始 pH 與溫度 vs 產氫速率之曲面圖與等高線圖。

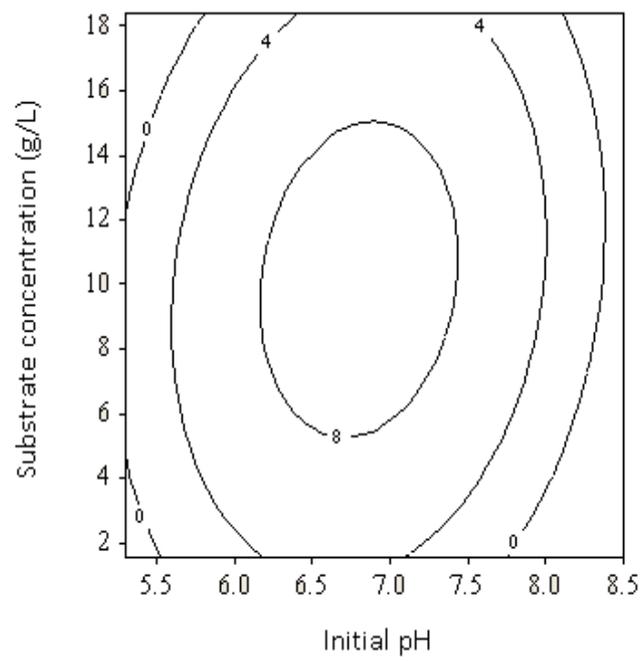
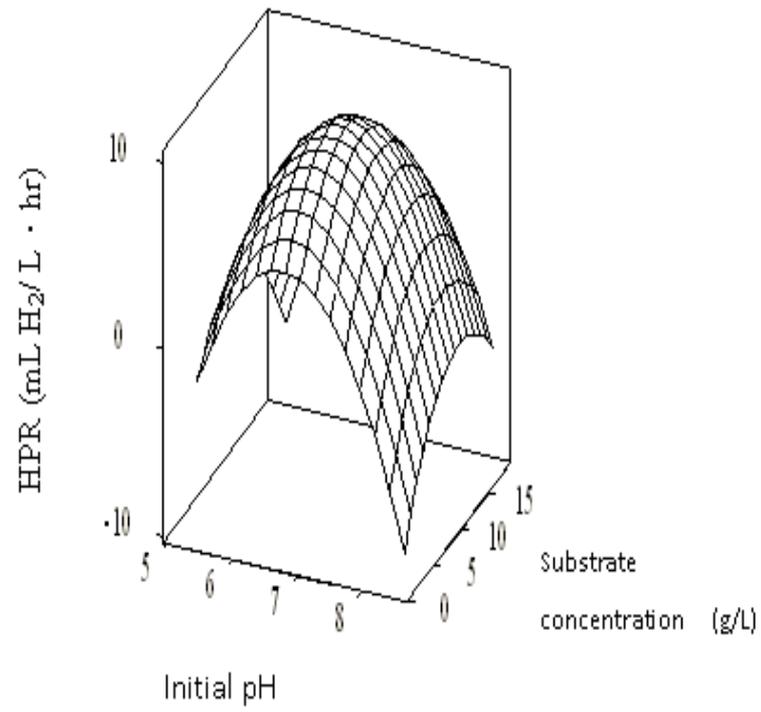


圖 5 初始 pH 與基質濃度 vs 產氫速率之曲面圖與等高線圖。

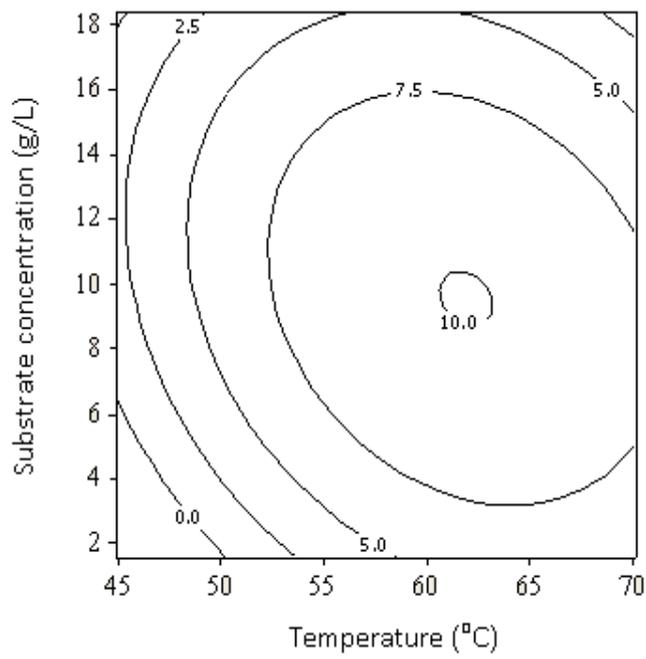
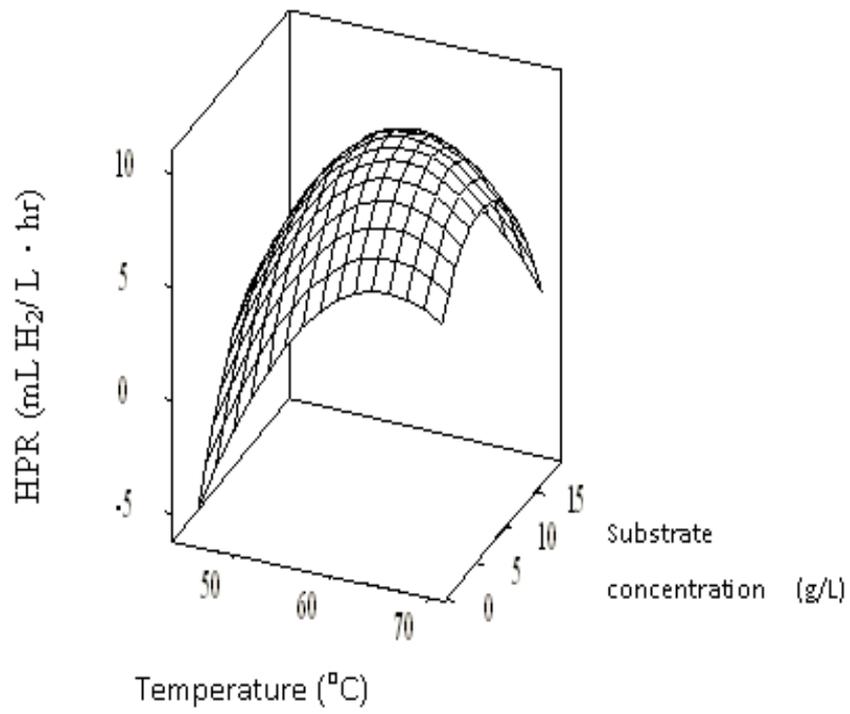


圖 6 溫度與基質濃度 vs 產氫速率之曲面圖與等高線圖。

表附件：

表 1 統計分析所獲得之 p-value

Term	p-value	
	HY (mL H ₂ / g cellulose)	HPR (mL H ₂ / L· hr)
X ₁ -pH	0.213	0.203
X ₂ -Temperature	0.089	0.069
X ₃ -Substrate concentration	0.030	0.015
X ₁ X ₂	0.985	0.151
X ₁ X ₃	0.344	0.360
X ₂ X ₃	0.778	0.347
X ₁ ²	0.036	0.014
X ₂ ²	0.003	0.013
X ₃ ²	0.021	0.01

表 2 RSM 最佳條件產氫能力之估計值與實際值之比較

Response variable	Optimal condition	Predicted value	Experimental value	Deviation (%)
H ₂ yield (mL H ₂ /g cellulose)	pH 6.90	95.05	104.34	2.6
	Temperature: 57.5°C α-cellulose: 7.7g/L			
H ₂ production rate (mL H ₂ /L·hr)	pH 6.90	10.01	13.66	2.3
	Temperature: 63°C α-cellulose: 9.3g/L			

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/02/21

國科會補助計畫	計畫名稱: 以反應曲面法探討水解纖維素產氫醱程序最適化之研究
	計畫主持人: 黃啟裕
	計畫編號: 99-2221-E-029-027- 學門領域: 能源科技
無研發成果推廣資料	

99 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：黃啟裕		計畫編號：99-2221-E-029-027-					
計畫名稱：以反應曲面法探討水解纖維素產氫醱酵程序最適化之研究							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	1	1	50%	篇	分離之本土纖維水解產氫菌株產氫特性發表於 SCI 期刊 Bioresource Technology, 此期刊之 IF value 為 4.36。
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	2	2	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

1. 學術成就：利用反應曲面法 RSM 決定一株嗜熱厭氣性產氫菌水解纖維素產氫之最佳化條件，此株嗜熱厭氣性纖維水解產氫菌之產氫特性研究先前已發表在 SCI 期刊 International Journal of Hydrogen Energy，此菌株在學術成果上極有價值。

2. 技術創新：反應曲面法 RSM 雖非創新技術，但研究成果顯示纖維素確實可做為氫醱酵的原料，對處理龐大農業廢棄物提供一能源轉換創新技術。