

私立東海大學化學工程暨材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏宏偉博士

Advisor : Hong-Wei Yen, Ph.D.

固定化 *Clostridium pasteurianum* 進行發酵產氫之研究

Fermentation of hydrogen produced by immobilized

Clostridium pasteurianum

研究生：陳裕仁 撰

Graduate student : Yu-Ren Chen

中華民國 106 年 1 月

January, 2017

中文摘要

全球石化燃料日益短缺、價格持續飆漲，能源耗竭及環境生態變遷更是全球關注的議題。在各種替代能源中，氫能尤其受到重視。在地球上，氫是含量是僅次於氧和矽的元素，且燃燒後的產物也是水，非常乾淨，符合環保要求。使用生質能源來替代石油除了可降低對於化石燃料的依賴外，生質能源具有永續再生且無二氧化碳淨排放等優點，亦可降低對環境的傷害。本實驗研究主要探討固定化載體種類及顆粒大小、碳源種類、轉速等對厭氧產氫之影響，提升重複批次氫氣生產速率，藉以提高氫氣發酵在經濟上之價值。

由實驗中可發現磚頭為一個適合的載體，既不干擾菌體的生長又可增加產氣速率，且從電子掃描顯微鏡 (SEM) 中可明顯看出，菌體大量附著於磚頭表面與內部。產氫實驗研究顯示，載體使用磚頭最佳粒徑為 2.00-3.36 mm 而最佳填充量為 20% (填充磚頭重量/反應槽體積, w/v)，其產氫濃度約 3.05 mol H₂/mol Sucrose。此外利用磚頭為固定化載體進行饋料批次發酵及三重複批次產氫發酵實驗其結果顯示，因饋料批次發酵後期槽體培養基鹽類濃度過高影響產氫發酵，而三重複批次與之相比有較好的產氫效果，且實驗確認磚頭做為固定化載體有良好的重複利用效果。

關鍵字：*Clostridium pasteurianum*、生物產氫、磚頭、微生物固定化、饋料批次、重複批次。

Abstract

Due to the energy crisis, more and more research focuses on the study about alternative energy, while hydrogen energy is the most promising direction. Not only hydrogen is sufficient in the earth, the product after energy transform “water” is also friendly to the environment. The topic of our research, immobilization of hydrogen with biomass, study the effects of different types of carrier, size, carbon source and rotational speed on hydrogen generation in order to enhance the economic value of hydrogen fermentation.

The SEM result shows that bricks is a suitable carrier due to the promotion on hydrogen generation rate and high interfaces which mycelium can adsorb on.

Also, this study indicates that the optimized condition of brick size ranges 0.84-2.34 mm, optimal filling brick ratio is 20% (w/v). The hydrogen concentration is about 3.05 mol H₂ / mol Sucrose.

Comparison between fed-batch and repeat-batch, result shows that the high concentration of salt in medium affects the hydrogen production in fed-batch; while repeat-batch has better performances on hydrogen production.

Keywords : *Clostridium pasteurianum* 、 Biological hydrogen production 、 brick 、 cell immobilization 、 fed-batch 、 repeat-batch.

目錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	II
目錄.....	III
表目錄.....	VIII
圖目錄.....	IX
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2.1 生質能源介紹.....	2
2.2 氫氣.....	3
2.3 產氫方法.....	4
2.3.1 熱化學法.....	5
2.3.2 電化學法	5
2.3.3 生物法.....	8
2.3.3.1 直接光解(Direct biophotolysis)	8
2.3.3.2 間接光解(Indirect biophotolysis).....	10
2.3.3.3 光醱酵(Photo-fermentation).....	11
2.3.3.4 暗醱酵(Dark-fermentation).....	12

2.4	<i>Clostridium</i> 介紹	15
2.5	固定化介紹.....	18
2.5.1	固定化方法.....	18
2.5.2	載體材料選擇.....	21
第三章	實驗材料與方法.....	24
3.1	實驗材料.....	24
3.1.1	實驗菌株.....	24
3.1.2	實驗藥品及氣體.....	25
3.2	實驗儀器.....	28
3.3	分析方法.....	30
3.3.1	菌體濃度分析方法.....	30
3.3.2	碳源(蔗糖、葡萄糖、乳糖、果糖)分析方法.....	30
3.3.3	揮發性脂肪酸(乙酸、丁酸) 分析方法.....	30
3.3.4	氣體(二氧化碳、氫氣)分析方法.....	31
3.4	實驗方法.....	32
3.4.1	菌種保存.....	32
3.4.2	培養基組成.....	32
3.4.3	接菌.....	32

3.5	實驗架構.....	33
3.6	懸浮菌液培養.....	34
3.6.1	探討不同碳源對產氫之影響.....	34
3.6.2	探討不同產氣空間對產氫之影響.....	34
3.6.3	探討添加阻隔液對產氫之影響.....	34
3.6.4	探討不同攪拌速率對產氫之影響.....	35
3.7	固定化菌體培養.....	35
3.7.1	探討不同固定化載體對產氫之影響.....	35
3.7.2	探討不同固定化載體(磚頭)粒徑對產氫之影響.....	35
3.7.3	探討不同固定化載體(磚頭)填充量對產氫之影響.....	36
3.7.4	饋料批次發酵程序 (Fed-batch)	36
3.7.5	重複批次發酵程序 (Repeated-batch)	36
第四章	結果與討論.....	38
4.1	懸浮菌液培養.....	38
4.1.1	探討不同碳源對產氫之影響.....	38
4.1.2	探討不同產氣空間對產氫之影響.....	41
4.1.3	探討添加阻隔液對產氫之影響.....	43
4.1.4	探討不同攪拌速率對產氫之影響.....	43

4.2	固定化菌體培養.....	45
4.2.1	探討不同固定化載體對產氫之影響.....	45
4.2.2	探討不同固定化載體(磚頭)粒徑對產氫之影響.....	47
4.2.3	探討不同固定化載體(磚頭)填充量對產氫之影響.....	48
4.2.4	饋料批次發酵程序 (Fed-batch)	49
4.2.5	重複批次發酵程序 (Repeated-batch)	51
第五章	結論與未來展望.....	53
5.1	結論.....	53
5.2	未來展望.....	54
	參考文獻.....	55
	附錄.....	62
	附錄 A.....	62
	附錄 B.....	63
	附錄 C.....	64
	附錄 D.....	65
	附錄 E.....	66
	附錄 F.....	67
	附錄 G.....	68

附錄 H.....	69
附錄 I.....	70

表目錄

表 2.1 產氫微生物種類.....	6
表 2.2 微生物產氫的優點與缺點.....	7
表 2.2、不同生物產氫程序優缺點比較.....	14
表 2.3 選擇固定化載體及方法時需考量的基本要件.....	22
表 2-5 不同固定化方法常用的載體材料.....	23
表 3.1 實驗所使用之藥品及氣體清單.....	25
表 3.2 為本研究所使用之儀器設備清單.....	28
表 3.3 為本研究所使用之 Endo 培養基.....	32
表 4.1 氫氣產量與文獻之比較.....	52

圖目錄

圖 2.1 氫氣生產樹狀圖.....	4
圖 2.3 間接性光解反應示意圖.....	11
圖 2.4 光醱酵反應之示意圖.....	12
圖 2.5 厭氧發酵之代謝路徑示意圖.....	17
圖 2.6 固定化方法.....	21
圖 3.1 <i>Cl. pasteurianum</i> 生長在厭氧瓶之外觀及 SEM 型態	24
圖 3.2 10 L 厭氧固定化培養系統.....	37
圖 3.3 10 L 厭氧固定化培養系統(繪圖).....	37
圖 4.1 不同碳源氫氣累積量與菌體濃度比較.....	38
圖 4.2 蔗糖氫氣累積量與菌體濃度.....	39
圖 4.3 葡萄糖氫氣累積量與菌體濃度.....	39
圖 4.4 果糖氫氣累積量與菌體濃度.....	40
圖 4.5 乳糖氫氣累積量與菌體濃度.....	40
圖 4.6 不同碳源菌體生長情形.....	41
圖 4.7 不同產氣空間氫氣累積量與菌體濃度比較.....	42
圖 4.8 不同產氣空間菌體生長情形.....	42
圖 4.9 添加不同體積之阻隔液對氫氣累積量與菌體濃度比較.....	43

圖 4.10 不同攪拌速率對體濃度之影響.....	44
圖 4.11 不同攪拌速率對氫氣累積量之影響.....	44
圖 4.12 不同固定化載體對氫氣累積量與菌體濃度比較.....	45
圖 4.13 菌體生長於磚頭上之 SEM 圖(X 1,000).....	46
圖 4.14 菌體生長於磚頭上之 SEM 圖(X 5,000).....	46
圖 4.15 不同粒徑之載體對氫氣累積量與菌體濃度比較.....	47
圖 4.16 不同固定化載體填充量對體濃度之影響.....	48
圖 4.17 不同固定化載體填充量對氫氣累積量之影響.....	49
圖 4.18 不同固定化載體填充量菌體生長情形.....	49
圖 4.19 饋料批次發酵程序生長曲線圖.....	50
圖 4.20 重複批次發酵程序生長曲線圖.....	51

第一章 緒論

自十九世紀中葉的工業革命開始，由於石油、煤炭及天然氣等化石能源的大量開發利用，礦物性原料迅速替代了生物性原料，使得傳統生物能源的應用逐漸地萎縮。然而，隨著人口增長與科技的進步，不論是生活或工業方面對燃料的需求量都越來越大，隨後伴隨的即是能源耗竭及生態環境嚴重受汙染等問題，因此，發展再生能源（包括太陽能、風力、生質能、地熱及水力）是未來全球追求永續能源發展的重要策略之一。生質能是目前眾所矚目的新能源，有機物如農作物的殘渣、動物牲畜的排泄物、製糖副產物、工業廢水等，經由自然或人為化學處理成液體、氣體或固體燃料，這種能源就是生質能源。生質能源代替石化燃料的使用，除了可降低對石化燃料的依賴外，生質能源具有永續再生且二氧化碳淨排放量等優點，亦可降低對環境的傷害。因此，開發乾淨、無汙染之再生能源儼然已成為全球關注之議題。

目前生質能源普遍因生產成本過高而無法進行商業量產，為了開發具有商業價值之生質能源，降低其成本使在未來有放大量產之可能性，在文獻中，工程師們企圖改善發酵程序來增加氫氣的產率，方法包括細胞回收再利用、細胞固定化等，來降低產物帶來的抑制效應（周世凱等，2009）。本研究即是利用固定化菌體來進行發酵程序實驗，以期望提高氫氣的產量與產率。

第二章 文獻回顧

2.1 生質能源介紹

現今人類所使用的能源有化石燃料、太陽能、核能、火力發電及再生能源等。目前全世界利用的能源，大約 95 % 是化石能源（如石油、煤炭及天然氣等），為最大的能源來源。但大量使用化石燃料的結果，使得全球每年至少產生 300 億噸 CO₂、CO、SO₂、灰渣等，造成空氣污染及酸雨，進而影響到人類的生存，及生態環境的平衡。加上石化燃料在地球的蘊藏量有限，預估煤炭約可使用 150~200 年、天然氣約 55~60 年，而石油僅約 35~40 年（靳叔彥，1998），所以迫切需要開發新的替代能源。

早期的生質能源是指將城市垃圾、工業廢水、製糖副產物、牲畜排泄物、林業廢棄木屑與農作物殘渣等有機物，藉由自然或人為化學處理成液體、氣體或固體燃料。現今受人矚目的生質能源與上述不盡相同，差別在於原料的選擇，即利用玉米、薯類、大豆與高粱等農作物中的澱粉成份，或利用草、稻稈、豆莢與樹枝等的纖維素經水解處理後，再經微生物發酵所形成的產物，如氫氣、甲烷、甘油、乙醇和丁醇等。

生質能源為一種再生能源，其優勢在於所使用的原料為可永續生產的資源。此外，生質能源還具有多項優點，如提供低硫燃料，可降低空氣污染；使用廢棄物、家畜糞便生產能量，可減輕廢棄物處理的負擔，減少環境公害；利用農村附近的生物資源來製造燃料，既可減少原料的運輸費用，殘渣又可充當農田肥料；工業廢料與城市垃圾轉換成熱能或電力，可維護環境品質，同時減少堆置掩埋所需的土地；與原有的礦物燃料相比更具有高燃點、高含氧、潤滑性佳與燃燒性能佳之特質；生物可降解性亦對土壤及水的污染傷害低（周世凱等，2009）。由此

可見，生質能源對於環境保護和能源替代的效益極佳，為目前能源開發中最具潛力之焦點。

2.2 氫氣

氫是宇宙中最輕且含量最豐富的元素；在地球表面上有 0.14 % 的氫氣，於空氣中包含 0.07 % 氫氣；一公升的空氣共重 1.2 公克，氫氣占了 0.09 公克；氫氣在常溫常壓下為氣態，在超低溫高壓下又可成為液態(Das et al., 2001)。嚴格來說，氫氣並不是一種能源，只能算是一種能源的載體(Energy carrier)，就如同碳元素在傳統的化石能源的碳循環(Carbon cycle)中所扮演的角色一般，如燃燒氫氣(H_2)會與空氣中的氧氣(O_2)結合釋放出能量與產生水(H_2O)，而生成的水如再經裂解又可還原成氫氣，週而復始的釋放和吸收能源，稱之為氫循環(Hydrogen cycle)。

氫氣在燃燒過程中會產生熱能，且燃燒後的產物為水，不會造成污染。且每單位重量氫氣所釋出之熱能(Exothermic energy)約為甲烷的 2.4 倍(曾怡禎等，2000)、石油的 3 倍；氫氣亦可填入燃料電池(Fuel cells)而轉化成電能(黃政賢等，2000)，從發電廠、太空梭，至筆記型電腦、行動電話，均可以氫燃料電池來提供電源。另外，氫氣引擎幾乎可達零污染排放，且燃燒效率高於汽油引擎，雖然目前造價較高，但卻為未來以環保導向及替代動力的主流。

氫氣除可當作能源載體使用外，亦是化學工業上的一項重要資源，如石化工業的加氫脫硫反應(Hydro-desulfurization)、哈伯法(Haber Process)製氫、合成甲醇及雙氧水製造等均需使用大量的氫氣，再者電子工業及不銹鋼製造過程中亦大量使用氫氣作為冷凍劑並移除氧氣以防止產品的氧化或腐蝕(曾重仁，1998；Ramachandran et al., 1998；Veziroglu, 1995)。由此可知，氫氣具有高熱值、可再循環利用和無污染等特性，因此被認為未來重要替代能源之一。

2.3 產氫方法

氫氣於近年來受到國際之重視，由於燃燒時不釋放二氧化碳，燃燒時主要之產物只有水，且其能值高於其他碳氫化合物，被視為目前最有潛力的替代能源。雖然氫氣可以由再生及非再生來源中獲得，但目前大約 96 % 的氫氣都是由非再生來源所產生 (Ferchichi et al., 2005)，主要製造方法大致可分為熱化學法、電化學法以及生物法。

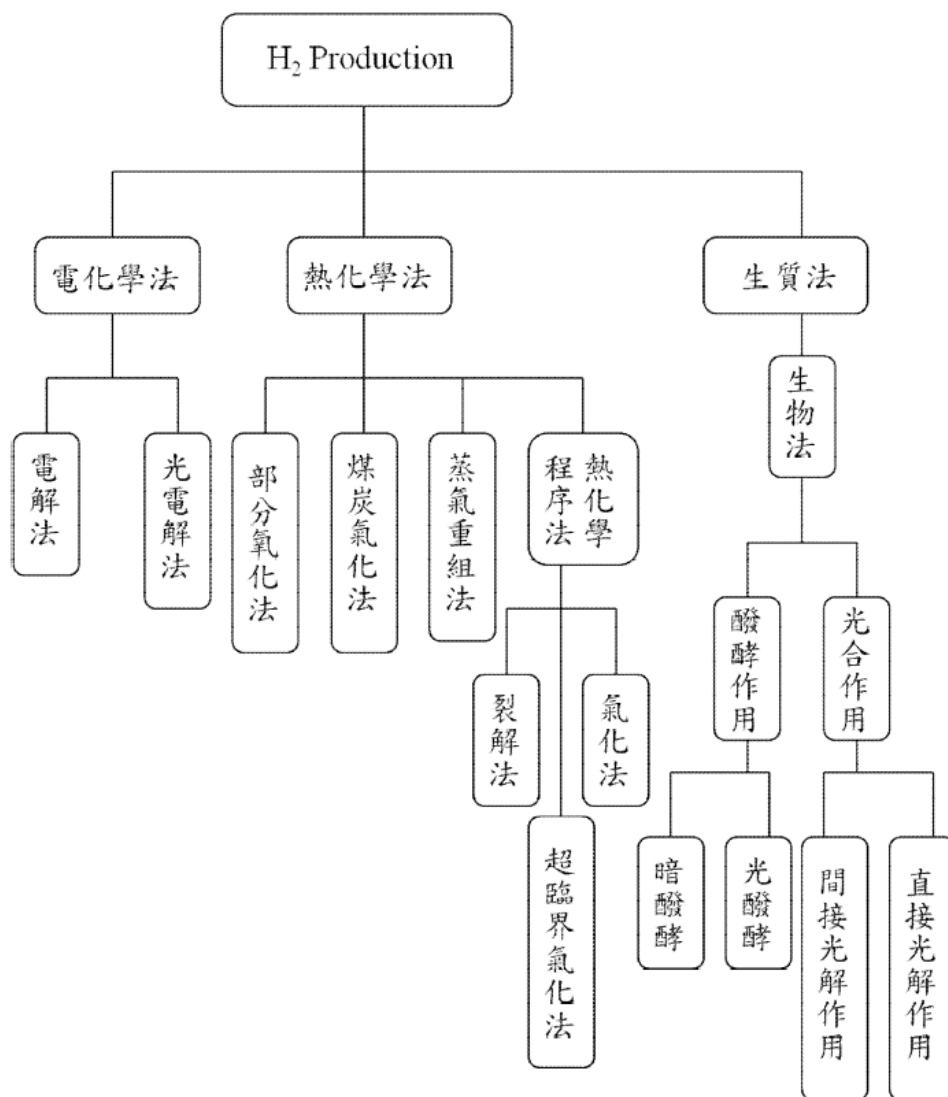


圖 2.1 氫氣生產樹狀圖(林祺能，2002)

2.3.1 熱化學法 (林祺能, 2002)

A. 蒸氣重組法：

以高溫水蒸氣與低碳數石化燃料(一般為甲醇)反應，產生氫氣與二氧化碳。

B. 煤炭氣化法：

高溫燃燒的煤炭通以水蒸氣，產生氫氣與一氧化碳。

C. 部分氧化法：

碳氫化合物在氧氣不足的狀況下燃燒反應，產生氫氣、一氧化碳與二氧化碳。

2.3.2 電化學法 (林祺能, 2002)

A. 電解法：

以直流電電解水（通常加入鹼性物質如氫氧化鉀以成為電解液），可分於陰極及陽極收集到高純度的氫氣與氧氣。

B. 光電解法：

利用光觸媒（如半導體材料）吸收光能而將水分解為氫氣與氧氣，然而光觸媒的穩定性欠佳之問題仍有待克服。

表 2.1 產氫微生物種類 (Das et al., 2001)

Broad classification	Name of the organisms
Green algae	<i>Scenedesmus obliquus</i>
	<i>Chlamydomonas reinhardii</i>
	<i>Chlamydomonas moewusii</i>
Cyanobacteria heterocystous	<i>Anabaena azollae</i>
	<i>Anabaena CA</i>
	<i>Anabaena variabilis</i>
	<i>Anabaena cylindrica</i>
	<i>Nostoc muscorum</i>
	<i>Nostoc spongiaeforme</i>
	<i>Westiellopsis prolifica</i>
Cyanobacteria nonheterocystous	<i>Plectonema boryanum</i>
	<i>Oscillatoria Miami BG7</i>
	<i>Oscillatoria limnetica</i>
	<i>Synechococcus</i> sp.
	<i>Aphanothece halophytico</i>
	<i>Mastidocladus laminosus</i>
Photosynthetic bacteria	<i>Phormidium valderianum</i>
	<i>Rhodobater sphaeroides</i>
	<i>Rhodobater capsulatus</i>
	<i>Rhodobater sulidophilus</i>
	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>
	<i>Rhodospirillum rubnum</i>
	<i>Chromatium</i> sp.
	<i>Miami PSB 1071</i>
	<i>Chlorobium limicola</i>
	<i>Chloroflexu aurantiacus</i>
<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	
<i>Halobacterium halobium</i>	
Fermentative bacteria	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>
	<i>Clostridium butyricum</i>
	<i>Clostridium pasteurianum</i>
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
	<i>Magashaera elsdenii</i>
	<i>Citrobacter intermedius</i>
<i>Escherichia coli</i>	

表 2.2 微生物產氫的優點與缺點 (Das et al., 2001)

微生物種類	優點	缺點
綠藻	<ul style="list-style-type: none"> • 從水生產氫氣 • 太陽能的轉化是植物和作物的十倍 	<ul style="list-style-type: none"> • 需要光源進行氫氣生產 • 氧氣對系統是有傷害的
藍綠細菌	<ul style="list-style-type: none"> • 從水生產氫氣 • 主要利用 Nitrogenase enzyme 生產 H₂ • 具有固氮作用 	<ul style="list-style-type: none"> • 產氫酶會被移除而終止產氫 • 需要陽光 • 氫氣裡面會有 30 % 的氧氣 • Nitrogenase 會受到氧氣的抑制 • 產生二氧化碳
光合菌	<ul style="list-style-type: none"> • 可以使用不同的廢棄物 • 光譜的適用範圍廣泛 	<ul style="list-style-type: none"> • 需要光源進行氫氣生產 • 會造成水污染 • 產生二氧化碳
醱酵菌株	<ul style="list-style-type: none"> • 無須提供光源亦可產氫 • 可利用不同碳源像是：澱粉、纖維二糖、蔗糖、木糖等等，或者是一些廢棄物都可以被利用當作料原 • 其副產物為丁酸、乳酸和醋酸等等 • 厭氧操作，所以沒有氧氣限制問題 	<ul style="list-style-type: none"> • 醱酵液要經過處理，造成水污染 • 產生二氧化碳

2.3.3 生物法 (林祺能, 2002)

利用微生物進行發酵產氫的一種方法，從發酵機制的不同可以分為光合作用或發酵作用兩種，產氫微生物種類如表 2.1 所示，其產氫的優點和缺點如表 2.2 所示。

A. 光合作用：

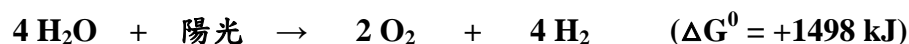
分為直接光解作用與間接光解作用，需光照進行光合作用產氫的微細藻類(Microalgae)藉由吸收太陽光能量，於厭氧的環境下進行水之光解作用(Biophotolysis)產生氫氣與氧氣。

B. 發酵作用：

分為光發酵與暗發酵，光合發酵乃是利用有機物當作電子提供者，在厭氧發酵過程中，藉由固氮酵素之作用產生氫氣；暗發酵則不需提供光源，以有機物當做電子提供者，將有機物分解成更小的分子並將伴隨產生部分電子藉由特定電子傳遞系統將水中氫質子(H⁺)還原成氫氣。

2.3.3.1 直接光解(Direct biophotolysis)

於厭氧光照條件下，藻類與藍綠細能將太陽光的能量進行水之生物直接光解作用(Direct biophotolysis)產生氫氣與氧氣，反應式如下：



在陽光照射下進行有光光合作用，將水分子分裂產生氧氣、質子(H⁺)與電子(e⁻)，而電子從水流動至兩個光合系統(PSI 和 PSII)，氫化酵素(Hydrogenase)再經由電子攜帶鐵氧化還原蛋白(Ferredoxin)產生氫氣(圖 2.2)；綠藻類(Green algae)微生物在厭氧情況下負責此反應的進行，其中 *Chlamydomonas reinhardtii*

的產氫能力已被證實(Melis et al., 2000; Kosourov et al., 2002)。

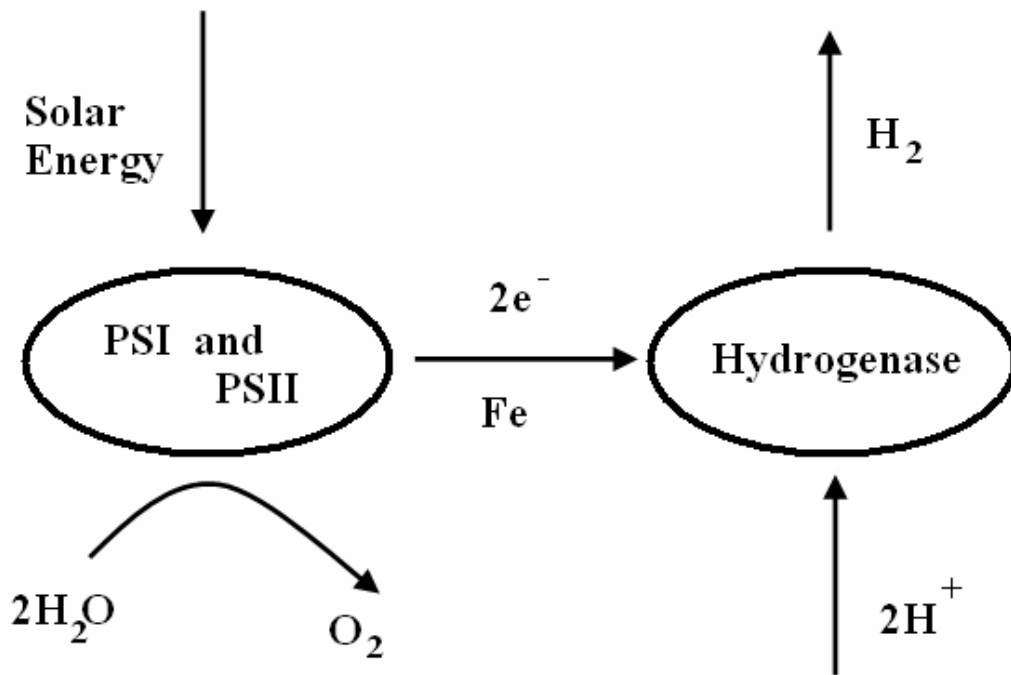
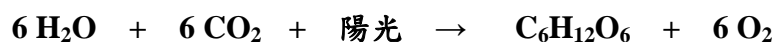


圖 2.2 直接性光解反應之示意圖(Ni et al., 2006a)

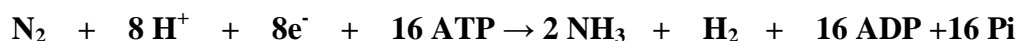
然而，微藻類產氫之速率遠低於二氧化碳之還原反應，因在生物光解作用期間，微量的氧氣會抑制產氫酵素的活性使得氫氣產量降低(Benemann et al., 1973)。因此微藻類只在黑暗中經過週期的厭氧情況下，產氫酵素才會被活化和合成，進而產生少量的氫氣。當回到光照下(厭氧)產氫量通常會增加，但最終還是回到一般的光合作用(氧氣產生、二氧化碳固定)。

2.3.3.2 間接光解(Indirect biophotolysis)

微細藻類也能藉由陽光的能量間接進行水之生物光解作用(Indirect biophotolysis)程序產生氫氣，其反應式如下：



除了上述之氫化酵素系統外，固氮細菌(Nitrogen fixing cyanobacteria)則是藉由固氮酵素(Nitrogenase)經由腺苷三磷酸(ATP)的消耗產生氫氣，尤其在缺乏氮氣(N₂)的情況下效果更顯著，其反應式如下：



間接性的光解作用是將光合成產氫分為兩階段的反應過程：第一階段為水被分解產生氧氣；第二階段則為電子被傳遞至質子而產生氫氣，並以 CO₂ 作為中間產物，進行 CO₂ 的固定及釋出(圖 2.3)。藍綠細菌(Cyanobacteria)具有氫化酵素可進行兩階段的光合作用產生氫氣，目前藍綠細菌 *Anabaen avariabilis* PK84 有較高的產氫量約 355,320 nmol H₂/h(Sveshnikov et al., 1997)。但是，利用光解反應進行產氫的最大問題是氧氣會抑制氫化酵素的活性而影響氫氣的生成，因此產氫階段僅能在無光照的情形下發生。

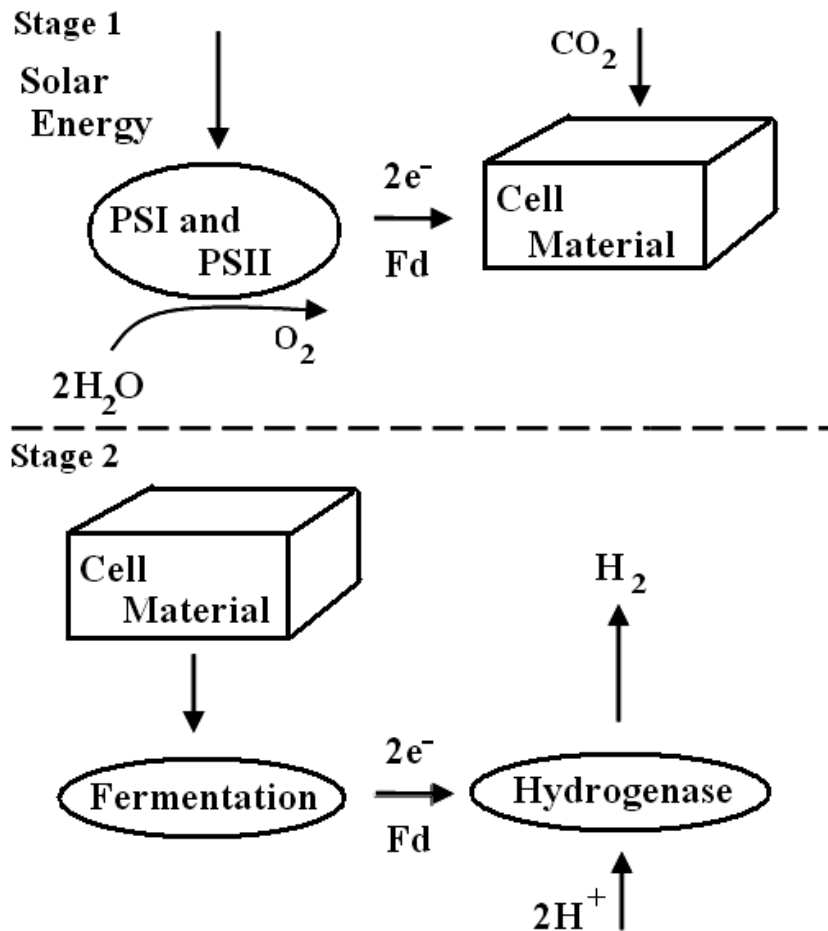
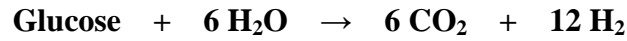


圖 2.3 間接性光解反應示意圖(Ni et al., 2006a)

2.3.3.3 光醱酵(Photo-fermentation)

光合菌(Photosynthetic bacteria)如紫色不含硫細菌(Purple non-sulfur bacteria)克服了氧氣的障礙並不以水當作產氫基質而利用有機質(如醣類、有機酸、農業廢棄物等)為電子提供者，在厭氧分解的過程中，藉由固氮酵素經由 ATP 之消耗作用來產生氫氣，此作用稱為光醱酵(如圖 2.4)。而紫色不含硫光合細菌是光合菌中的代表，有許多關於 *Rhodospseudomonas*、*Rhodobacter* 和 *Rhodospirillum* 等研究指出光合菌被認為是最具發展性的微生物產氫系統(Miyake et al., 1987; Fascetti et al., 1995; Franks et al., 1998)，且在反應系統中，分解 1 mole 的葡萄糖可生成 12 mole 的氫氣，相較於厭氧細菌產氫之理論轉化率高出 8 mole；但

是由於光合細菌大多利用固氮酵素產氫，因此產氫步驟的自由能較高 (Miyake et al., 1999) ，以致影響其產氫速率。光合產氫之反應式如下：



除此之外，其與光合作用系統一樣需要龐大的反應槽體積(Levin et al., 2004) ，並受限於光照強度、波長與日夜交替之天氣變化影響，故利用光醱酵系統產氫仍不符合經濟效率。

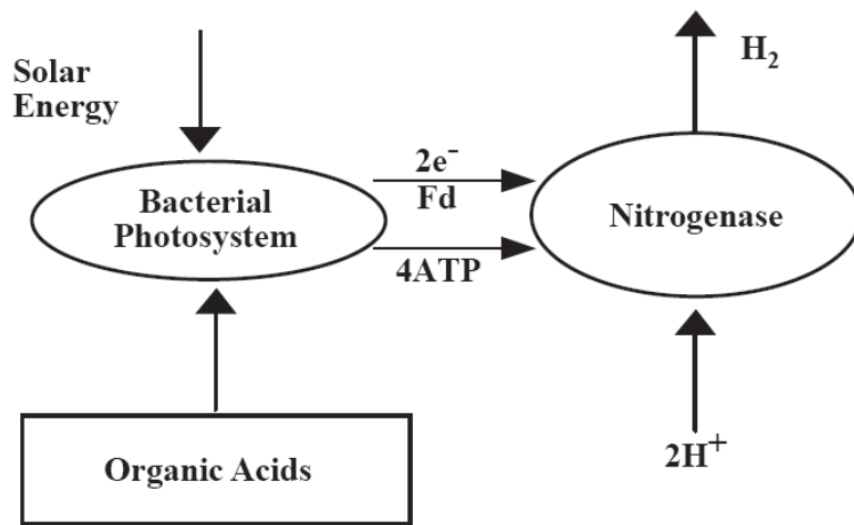


圖 2.4 光醱酵反應之示意圖(Ni et al., 2006a)

2.3.3.4 暗醱酵(Dark-fermentation)

暗醱酵產氫乃厭氧微生物在缺氧或厭氧的情況下對有機質進行厭氧生物分解時所伴隨產生氫氣的過程，因不需光源作為能量來源而稱之暗醱酵，或稱厭氧醱酵產氫。微生物在厭氧代謝的過程中，暗醱酵產氫缺少氧氣為電子接受者，需要其它物質取代氧氣扮演電子接受者的角色，例如 H⁺就被還原成氫氣、硝酸鹽被還原成氮氣、硫酸鹽被還原成硫化氫(H₂S)等。暗醱酵微生物廣泛的存在於沼澤、污泥、溫泉和牛胃等地方，在厭氧的環境下醱酵菌可以將複雜的有機物水

解成小分子有機物如：胺基酸、單醣等小分子單體，再經酸化反應生成揮發性有機酸及醇類等物質，同時釋放出氫氣及二氧化碳，最後由一些甲烷菌消耗系統中氫氣，進行甲烷化反應產生甲烷，而厭氧暗醱酵產氫則是利用前處理方法如：熱篩、酸篩等去除植種污泥中的甲烷菌，截斷甲烷化反應，使反應最終氣態產物為氫氣及二氧化碳。

綜合上述四種產氫方法，暗醱酵產氫系統具有下列幾項工程上的優點(Das et al., 2001; Hallenbeck et al., 2002; Levin et al., 2004)：

- A. 菌種產氫代謝率高。
- B. 菌種可自有機質不斷地產氫。
- C. 系統中的微生物成長迅速。
- D. 發酵槽體積小。
- E. 操作條件要求較低。
- F. 可利用有機廢水作為基質。

表 2.2、不同生物產氫程序優缺點比較(Nath et al., 2004)

Process	Type of microorganisms	Advantages	Disadvantages
Direct biophotolysis	Green algae	<ul style="list-style-type: none"> · Can product H_2 directly from water and sunlight. · Solar conversion energy increased by ten-folds as compared to trees, crops. 	<ul style="list-style-type: none"> · Requires high intensity of light. · O_2 can be danferous for the system. · Lower photochemical efficiency.
Indirect biophotolysis	Cyanobacteria	<ul style="list-style-type: none"> · Can produce H_2 from water. · Has the ability to fix N_2 from atmosphere. 	<ul style="list-style-type: none"> · Uptake hydrogenase enzymes are to be removed to stop degradation of H_2. · About 30 % O_2 present in gas mixture O_2 has an inhibitory effect on nitrogenase.
Photo fermentation	Photosynthetic bacteria ⁴	<ul style="list-style-type: none"> · A wide spectral light energy can be used by these bacteria. · Can use different waste materials like distillery effluents, waste etc. 	<ul style="list-style-type: none"> · Light conversion efficiency is very low, only 1~5 %. · O_2 is a strong inhibitor of hydrogenase.
Dark fermentation	Fermentative bacteria	<ul style="list-style-type: none"> · It can produce H_2 all day long without light . · A variety of carbon sources can be used as substrates. · It produces valuable metabolites such as butyric, lactic and acetic as by products. · It is anaerobic process, so there is no O_2 limitation problem. 	<ul style="list-style-type: none"> · Relatively lower achievable yields of H_2. · As yields increase H_2 fermentation becomes thermodynamically unfavorable. · Product gas mixture contains CO_2 which has to be separated.

2.4 *Clostridium* 介紹

自然環境中許多的細菌均具有產氫的能力，這些細菌中有部分是兼性厭氧菌，如 *Enterobacter*；有部分是可產生內孢子的孢子菌，如 *Clostridium*。根據產氫菌的特性可以設計不同前處理方式來將產氫菌由污泥或土壤中分離出來，目前已知的前處理方法有曝氣法及加熱法，曝氣法的步驟為對污泥進行強烈曝氣後再進行培養。加熱法則是對污泥進行加熱，溫度維持在 100°C 維持 20 分鐘，可分離出產孢子菌。*Clostridium* 菌屬為目前已知產氫菌中產氫能力較佳的菌種，外型為短桿狀，適合生長於厭氣、中溫(25°C~60°C)及中性 pH 的環境下，*Clostridium* 在較不適合生長的環境下會產生內孢子而進入休眠狀態，此類菌屬除了能夠分解碳氫化合物外，傳統上並以使胺基酸醱酵著名(Thomas et al., 1994 ; Takeshima et al., 1993)。

Clostridium 的孢子屬於內孢子(Endospores)，產生於細菌體內末端為此菌屬特有之結構，每一株菌體可生成一個孢子，*Clostridium* 的孢子特徵為位於菌體的末端，一般較菌體寬，與其它孢子菌的不同在於其他孢子菌的孢子較小且位於菌體中央 (Prazmowski, 1880)。一般而言，各種產孢菌各有其形成內孢子的最適合條件，包括 pH、供氧狀況、營養成分、溫度及培養基中的離子種類與濃度等。其中以碳源及氮源的供應狀況對形成孢子的影響最大。環境若無可供菌體利用之氮源或易利用之碳源，則較易形成孢子。反之，充足的氮源及易利用的碳源(如葡萄糖)則抑制孢子的形成。

孢子的形成對菌體本身是一次劇烈的生理及生化的改變，菌體與孢子會先出現兩個細胞核，之後形成具有兩層細胞膜的個體，稱為前驅孢子。當細胞進行至此一步驟時，除了繼續形成內孢子外別無選擇，當前驅孢子的厚壁形成時，孢子才算形成，整個過程約需 8~10 小時的時間。內孢子對乾燥、毒性物質、輻射

線以及高熱等，均具強烈的抵抗能力。其萌發也需要一定的條件。

凡是醱酵反應，氧化反應與還原反應均需維持在一平衡點上。其反應式右邊反應產物的電子數必須與反應式左邊反應受質的電子數平衡。許多醱酵作用中，電子平衡的保持來自分子氫， H_2 的產生。在 H_2 的產生過程中，來自水的 H^+ ，係作為電子受體。 H_2 的產生通常與菌體內鐵氧化還原蛋白(Ferredoxin)，這種低氧化還原電位的電子攜帶者有關。從鐵氧化還原蛋白到 H^+ 的電子傳遞，是由氫化酶(Hydrogenase)所催化進行的。以熱力學的觀點而言，產生 H_2 的反應事實上並不利，以致大部分的醱酵菌只能伴隨著其它的醱酵產物而產生相當少量的氫氣，所以 H_2 的產生主要係用來保持氧化還原的平衡。例如，若 H_2 的產生受阻時，則其它醱酵產物的氧化還原平衡將會被啟動而導致產生更具還原性的性質。所以，許多會產生 H_2 的醱酵菌都會產生乙醇與乙酸。而由於乙醇比乙酸更具還原性，故當 H_2 的產生受阻時，乙醇之形成比較容易。

許多厭氧菌會產生醋酸作為醱酵產物之一。醋酸的產生因能讓菌體利用受質階段磷酸化作用產生額外的 ATP 之故，大有好處。產醋酸過程所生成的重要中間產物是乙醯-CoA，為一種高能性中間產物。乙醯-CoA 能被轉變成乙醯磷酸(Acetyl phosphate)，而乙醯磷酸的高能磷酸根則接著會被傳予 ADP，而導致 ATP 的合成。被轉變成乙醯-CoA 的受質之一是為糖酵解主要的丙酮酸(Pyruvate)。但丙酮酸的轉變成乙醯-CoA，是一種氧化過程，因為丙酮酸遠比乙醯-CoA 更具還原性。其反應產生多餘的電子必須或用以製造更具還原性的終產物，或用以產生 H_2 ，圖 2.5 為厭氧發酵之代謝路徑示意圖。

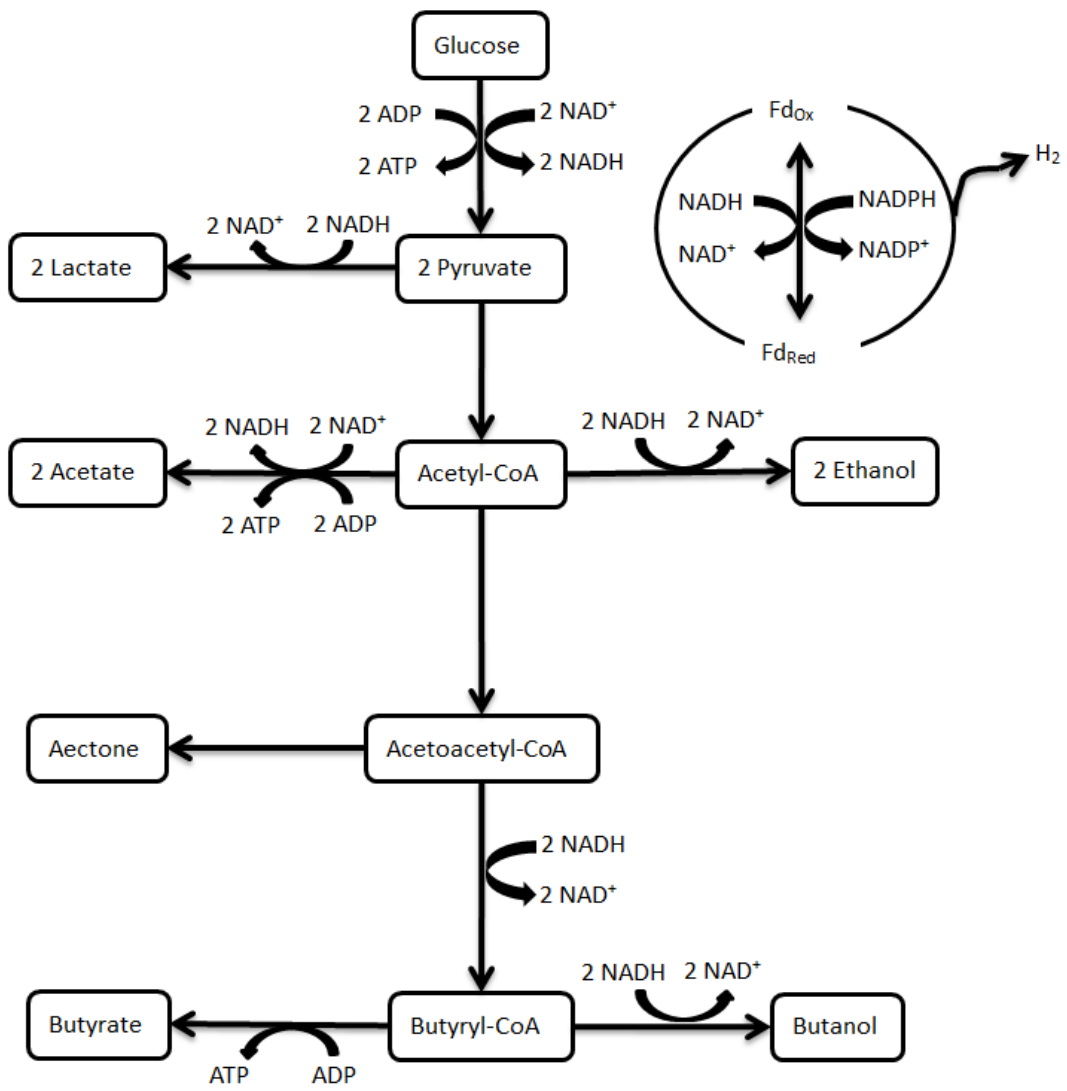


圖 2.5 厭氧發酵之代謝路徑示意圖

2.5 固定化介紹

固定化微生物技術是利用化學或物理程序將懸浮微生物封閉或限制於某一特定的空間區域內，使微生物在反覆連續操作的條件下仍能保持活性，維持較高的細胞濃度及加快生產速度，即藉由人工的方式將懸浮微生物固定或限制在固態載體（Carriers）中，使微生物由隨機移動狀態轉變成固定狀態。相較於懸浮微生物的反應系統，由於有載體的保護，固定化微生物較不易受外界環境的影響，且固定化微生物可以重複使用，延長微生物的使用時間以及維持操作系統的穩定性（吳建一等，2006）。因此，固定化微生物具有微生物密度高、反應速度快、抗污能力強、微生物流失少、產物容易分離和處理設備小等優點。

2.5.1 固定化方法

固定化方法的程序步驟會影響微生物的活性，因此，微生物的可利用性、再利用性及穩定性都是選擇固定化方法時必須考慮的因素。近幾年來年來，依照固定化方法與固定載體不同，大致可分為四大類型（Pilkington et al., 1998）：

A. 附著或吸附於固定載體表面：

 吸附法（Adsorption）

 共價鍵結法（Covalent binding）

 離子鍵結法（Ionic binding）

B. 包埋於多孔隙的載體中：

 包埋法（Entrapment）

C. 以自然或人工誘導方式使微生物絮凝：

交聯法 (Cross-linking)

D. 利用機械方式限制微生物活動空間：

包覆法 (Encapsulation)

膜限制法 (Membraneconfinement)

吸附法 (圖 2.6 a) 是利用微生物與載體間的物理作用力，如凡德瓦力、氫鍵等靜電力和疏水性作用力，使微生物附著在載體上。由於利用微生物與載體間的表面作用力使微生物附著於載體上，不需要額外的化學活化，故相較於其他固定化方法具有操作簡單、固定化條件溫和、細胞活性損失小與載體可以反覆使用等優點；但也由於微生物與載體間表面作用力都非常微弱，因此 pH 值、溫度、離子強度、基質濃度的改變與進料流動速率、攪拌、顆粒之間的磨損都會導致脫附發生，造成微生物的損失，也增加回收產品的難度 (吳建一等，2006)。

共價鍵結法 (圖 2.6 b) 藉由共用電子對所形成的共價鍵，使微生物與載體緊連在一起。微生物與載體間的連結，可直接結合，即利用特殊試劑活化載體後，加入微生物進行偶合反應；或透過間隔基 (Spacer) 結合，此間隔基可改變微生物與載體間共價鍵之鍵長，藉以提高微生物的移動性。相較於吸附法有較堅固地結合與不易脫附等優點；但由於共價鍵結法所需之反應條件嚴苛，微生物容易失去活性，且不易脫附亦使載體再生困難 (吳建一等，2006)。

離子鍵結法 (圖 2.6 c) 利用微生物與載體間所帶電荷相反形成之靜電吸引力，使微生物與載體連結。相較於吸附法，微生物與載體連結更牢固，且程序簡便不易對微生物造成傷害；但相較於共價鍵結法，微生物與載體間鍵結力仍不足，易受外在環境，如 pH 值、溫度、離子強度與緩衝溶液之影響而脫附 (吳建一等，

2006)。

包埋法 (圖 2.6 d) 將微生物包埋在具有晶格的天然高分子多醣類或合成高分子凝膠中，從而使微生物固定化。其特點為隨著使用目的不同，可將固定化微生物製成不同外觀形狀，如球狀、圓柱狀、似纖維狀與似平板狀等，具有固化、成型方便、對微生物活性影響小與固定化細胞密度高等優點 (吳建一等，2006)；但微生物菌量的不斷累積會使得基質與微生物間在質傳上有一定的影響 (Kourkoutas et al., 2004)。

交聯法 (圖 2.6 e) 為一種不使用載體的固定化技術，藉由雙官能基或多官能基的反應劑，可使微生物相互鍵結在一起形成三級立體交織網，即不溶性凝聚物。相較其他固定化方法，交聯法的製備程序簡單；但製備出的凝聚物不夠堅固，且基質礙於質傳限制而無法進入凝聚物內部，導致微生物活性降低 (吳建一等，2006)。

包覆法 (圖 2.6 f) 藉由外層的高分子半透膜限制微生物的活動，其內部為一液態環境，而微生物懸浮於水溶液環境中，屬於膜限制法 (圖 2.6 g) 的一種。缺點為固定化微生物之膜有生物淤積 (Gryta, 2002)、質傳限制 (Lebeau et al., 1998) 和膜汙染等問題。

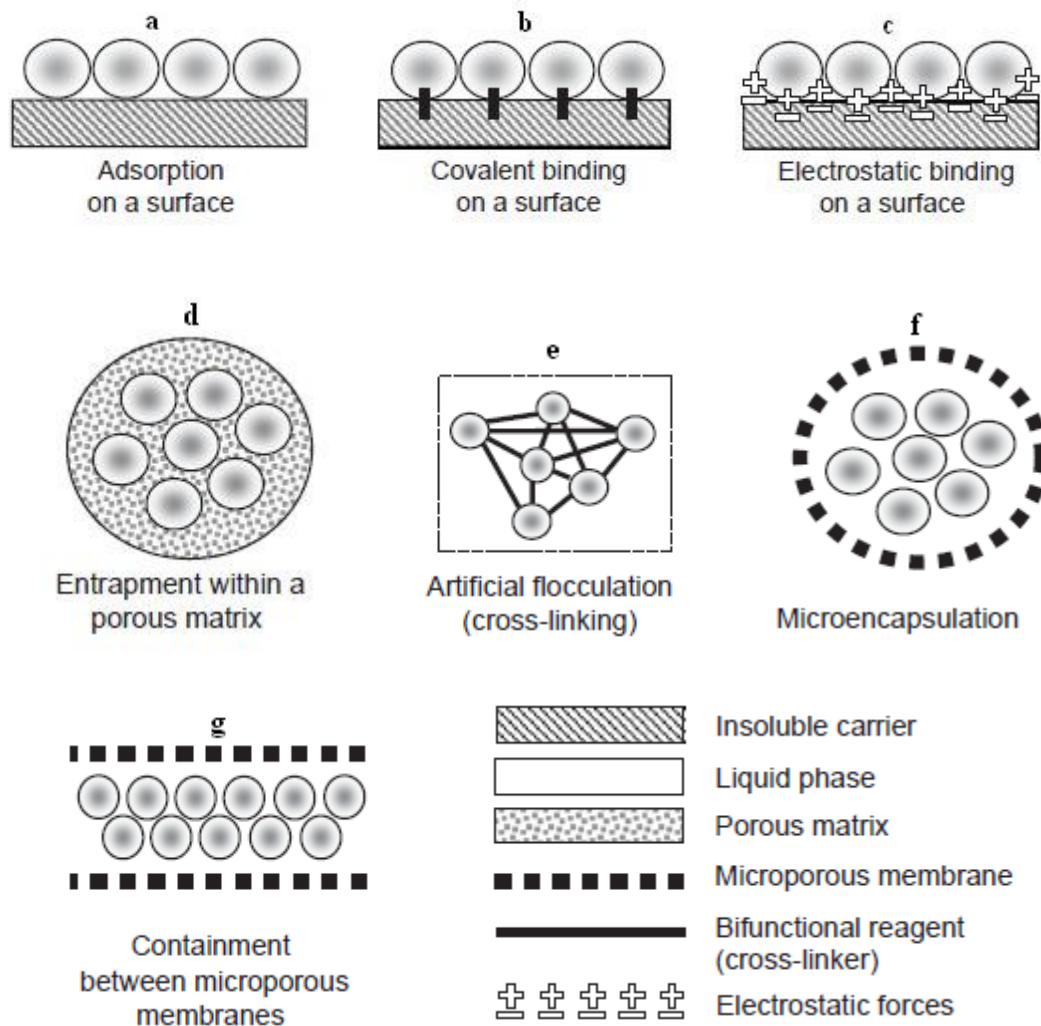


圖 2.6 固定化方法(a)adsorption;(b)covalent binding;(c)ionic binding ;
(d)entrapment;(e)cross-linking;(f)encapsulation;(g)membrane confinement

2.5.2 載體材料選擇

載體材料是影響微生物固定化發酵之重要的因素，理想的固定化載體應不影響微生物活性、質傳性能良好、化學與物理性質穩定、機械强度高，且在人體安全與環境永續的考量下，載體本身需具備無毒性、生物相容性(Biocompatibility)、生物可降解性(Biodegradability)、載體再生(Regenerate)容易、壽命長與價格低廉等(表 2.3)。

表 2.3 選擇固定化載體及方法時需考量的基本要件 (吳建一等, 2006)

特性	考慮因素
物性、化性	強度，非壓縮顆粒，有效表面區域，形狀 (顆粒、薄膜、纖維狀)，孔洞程度，顆粒體積，滲透性，密度，微生物生長空間，流動速率。親水性 (載體與水的鍵結)，對微生物不具反應性，載體的再生性及重複使用。
穩定性	微生物產率，微生物活性再生與維持，載體穩定性。
抗性	外來菌體的侵害，化學藥劑分解，pH，溫度，有機溶劑，微生物防禦機制 (蛋白質)。
安全性	生物相容性 (免疫反應)，添加反應劑之毒性，製備過程及最終產物對人體健康和安全的影響，應用於食品、醫藥及醫學上需特殊之固定化製備。
經濟效益	載體的取得及成本，化學藥劑，特殊設備，技術需求，環境衝擊，工廠規模，放大製程的可行性，連續製程，載體的重複使用性，CRL* 或 zero 污染。
反應	流動速率，微生物負荷量及生產率，反應動力學，子反應，多微生物系統，批次、CSTR、PBR、FBR、ALR** 等，基質與產物質傳限制。

*CRL：推測所承受風險程度 (calculated risk level)；**CSTR：連續攪拌槽反應器(continuous stirred tank reactor)、PBR：填充床反應器(packed bed reactor)、FBR：流體化床反應器(fluidized bed reactor)、ALR：氣舉式反應器(air lift reactor)

表 2-5 不同固定化方法常用的載體材料(吳建一等,2006; Kourkoutas et al., 2004)

methods	metarials
adsorption	aluminium、propylagarose、titania-activited glass、synthetic resin、silica gel、wood、sawdust、coke、bonechar、brick
covalent binding	cellulose、dextran、starch、porous glass、porous silica、polyacrylamide、nylon-acrylate copolymer
ionic binding	polygorskite、montmorilonite、hydromica、porous porcelain
entrapment	alginates、 κ -carrageenan、agar、chitosan、gelatin、collagen
cross-linking	glutaraldehyde、toluene diiscocyanate、hexamethylene diisocyanate
encapsulation	glycol、polyphenols、bishalogen formiate、polystyrol

第三章 實驗材料與方法

3.1 實驗材料

3.1.1 實驗菌株

本實驗所使用的菌株 *Clostridium pasteurianum* CH₄，取自成功大學化工系張嘉修老師實驗室。*Clostridium pasteurianum* 屬於革蘭氏陽性菌，外型為短桿狀(直徑 0.5-2 μm ，長度 3 μm)，生長於厭氧、中溫(37°C)及 pH 中性的環境下，如圖 3-1 所示。

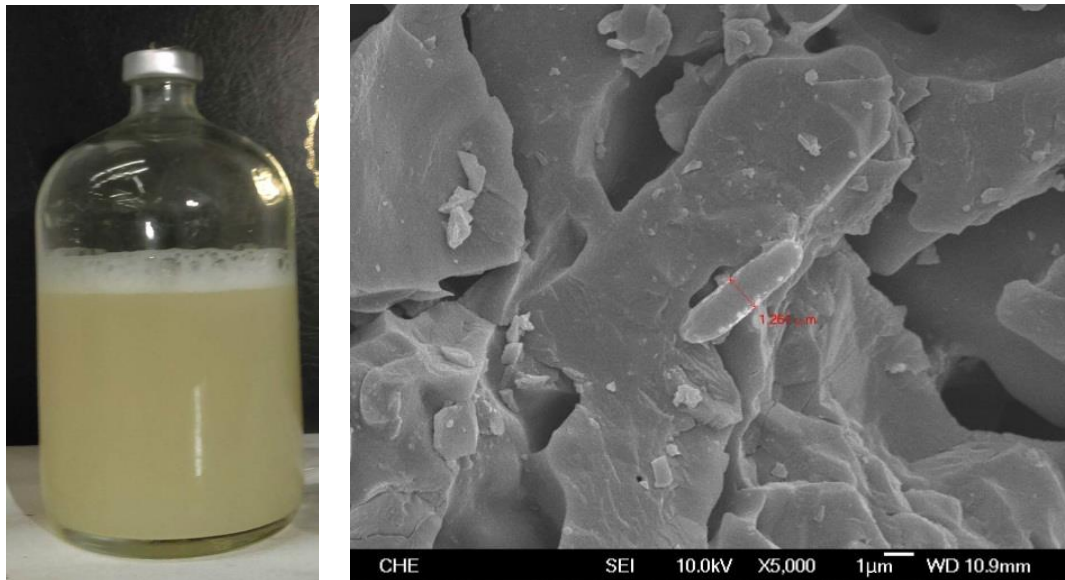


圖 3.1 *Cl. pasteurianum* 生長在厭氧瓶之外觀及 SEM 型態

3.1.2 實驗藥品及氣體

表 3.1 實驗所使用之藥品及氣體清單

中文名稱	英文名稱	廠牌
果糖	Fructose	ALFA AESAR
乳糖	Lactose	JT-BAKER
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
蔗糖	Sucrose	台糖
碳酸氫鈉	Sodium hydrogen carbonate	SHOWA
碳酸氫銨	Ammonium hydrogen carbonate	SHOWA
磷酸氫二鉀	Dipotassium hydrogen phosphate	SHOWA
氯化鎂	Magnesium chloride hexahydrate	SHOWA
硫酸錳	Manganese(II) sulfate monohydrate	SCHARLAU
硫酸銅	Copper(II) sulfate pentahydrate	SHOWA
氯化鈷	Cobalt(II) chloride hexahydrate	AENCORE
硫酸亞鐵	Ferrous Sulfate	聯工化學試藥

(接續前頁)

中文名稱	英文名稱	廠牌
巯基醋酸鈉	Sodium thioglycolate	TCI
L-半胱氨酸	L-Cysteine hydrochloride	ALFA AESAR
刃天青鈉	Resazurin sodium salt	SIGMA
鹽酸	Hydrochloric acid	SCHARLAU
硫酸	Sulfuric acid	SCHARLAU
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	SHOWA
氯化鈣	Calcium chloride	SHOWA
海藻酸鈉	Sodium alginate	ACROS
乙酸	Acetic acid	SCHARLAU
丁酸	Butyric acid	ACROS
活性碳(粒狀)	Active carbon	聯工化學試藥
葵花油	Sunflower Oil	佳格食品

(接續前頁)

中文名稱	英文名稱	廠牌
甘油	Glycerol	SHOWA
二氧化碳	Carbon dioxide	晒輝氣體公司
氫氣	Hydrogen	晒輝氣體公司
氮氣	Nitrogen	晒輝氣體公司
甲烷	Methane	晒輝氣體公司

3.2 實驗儀器

表 3.2 為本研究所使用之儀器設備清單

儀器設備	廠牌	型號
電子天平	Precisa	BJ 100M
磁石攪拌加熱器	CORNING	PC-420D
pH 計	INSPECTED	PL-700PV
高壓蒸氣滅菌釜	TRIDENT	EA635
無菌操作台	HIGH TEN	3BH-24
超純水系統	RODA	D11031218.1
試管震盪器	IKA	MS1 minishaker
高效液相層析儀 RI detector	Hitachi	RI 5450
氣相層析儀 Gas Chromatograph	Thermo	Trace 1300
超音波震盪器	DECTA	DC300H
紅外線水分蒸發儀	IR 35	DENVER INSTRUMENT
微電腦分光光度計	Thermo	GENESYS 10UV

(接續前頁)

儀器設備	廠牌	型號
數位型離心機	HSIANTAI	CN-650
高速中型離心機	Hettich	Universal-32R
濕式氣體流量計	Sinagawa	W-NK-1
強力磁石攪拌器	雷伯斯	-
蠕動泵浦	Shishin	SH-P100
恆溫水槽	DENG YNG	G-10
烘箱	LIAN SHEN	LO-150

3.3 分析方法

3.3.1 菌體濃度分析方法

1. 取 5 mL 菌液，在轉速 7000 rpm 下離心 10 分鐘，去除上清液取得菌體，再加入 5 mL 去離子水，利用試管震盪器使菌體與去離子水充分混和洗去雜質後，再以相同轉速與時間進行離心，去除上清液，利用紅外線水分蒸發儀測得到菌體乾重 (Dry Cell Weight, DCW)。
2. 取不同濃度之已洗淨菌液，利用分光光度計在波長 600 nm 下測量光學密度 (Optical density, O.D)。依不同濃度所測得的 DCW 和 O.D 值作圖，獲得檢量線： $DCW(g/L)=1.1122 \times O.D_{600}-0.0077$ 。

3.3.2 碳源(蔗糖、葡萄糖、乳糖、果糖)分析方法

1. 將發酵液置入離心管中，在轉速 7000 rpm 下離心 10 分鐘，將菌體與上清液分離，取上清液並適當稀釋，以 Membrane filter(0.22 μ m pore size, Chrom Tech)過濾。
2. 利用高效液相層析儀 HPLC (Hitachi RI detector 5450, Hitachi pump 5110, Hitachi Auto Sampler 5210, Hitachi High-Technology Corporation, Japan) 分析 VFA 濃度。
3. 分析條件：管柱 C18 (COREGEL-87H3, 250 mm \times 4.6 mm, Taiwan)，移動相為 0.01 N H₂SO₄，流速 1.5 mL/min，注射量 50 μ L。

3.3.3 揮發性脂肪酸(乙酸、丁酸) 分析方法

1. 將發酵液置入離心管中，在轉速 7000 rpm 下離心 10 分鐘，將菌體與上清液分離，取上清液並適當稀釋，以 Membrane filter (0.22 μ m pore size,

Chrom Tech)過濾。

2. 利用高效液相層析儀 HPLC (Hitachi RI detector 5450, Hitachi pump 5110, Hitachi Auto Sampler 5210, Hitachi High-Technology Corporation, Japan) 分析 VFA 濃度。
3. 分析條件：管柱 C18 (COREGEL-87H3, 250 mm ×4.6 mm, Taiwan)，移動相為 0.01 N H₂SO₄，流速 1.5 mL/min，注射量 50 μL。

3.3.4 氣體(二氧化碳、氫氣)分析方法

1. 利用氣密針採集發酵槽出氣口之氣體。
2. 利用氣相層析儀 Gas Chromatography (Trace 1300) 進行分析。
3. 分析條件(H₂)：管柱 Packed Column (Molecular Sieve 13 x 30/60)，氣相層析儀烘箱 (Oven) 溫度設定為 50°C；注射孔 (Injector) 溫度為 120°C；熱導偵測器 (Thermal conductivity detector, TCD) 溫度為 140°C；運送氣體 (Carrier gas) 為氮氣 (Nitrogen)，樣品注射量為 1 mL。
4. 分析條件(CO₂)：管柱 Packed Column (Molecular Sieve 13 x 30/60)，氣相層析儀烘箱 (Oven) 溫度設定為 50°C；注射孔 (Injector) 溫度為 120°C；熱導偵測器 (Thermal conductivity detector, TCD) 溫度為 140°C；運送氣體 (Carrier gas) 為氮氣 (Nitrogen)，樣品注射量為 1 mL。

3.4 實驗方法

3.4.1 菌種保存

將菌體接至 Endo 培養基並放入恆溫水槽中以 37 °C 培養 36 小時，取 0.8 mL 菌液和 0.2 mL 無菌甘油於微量離心管中均勻混合後，放入 -20 °C 冰箱保存。

3.4.2 培養基組成

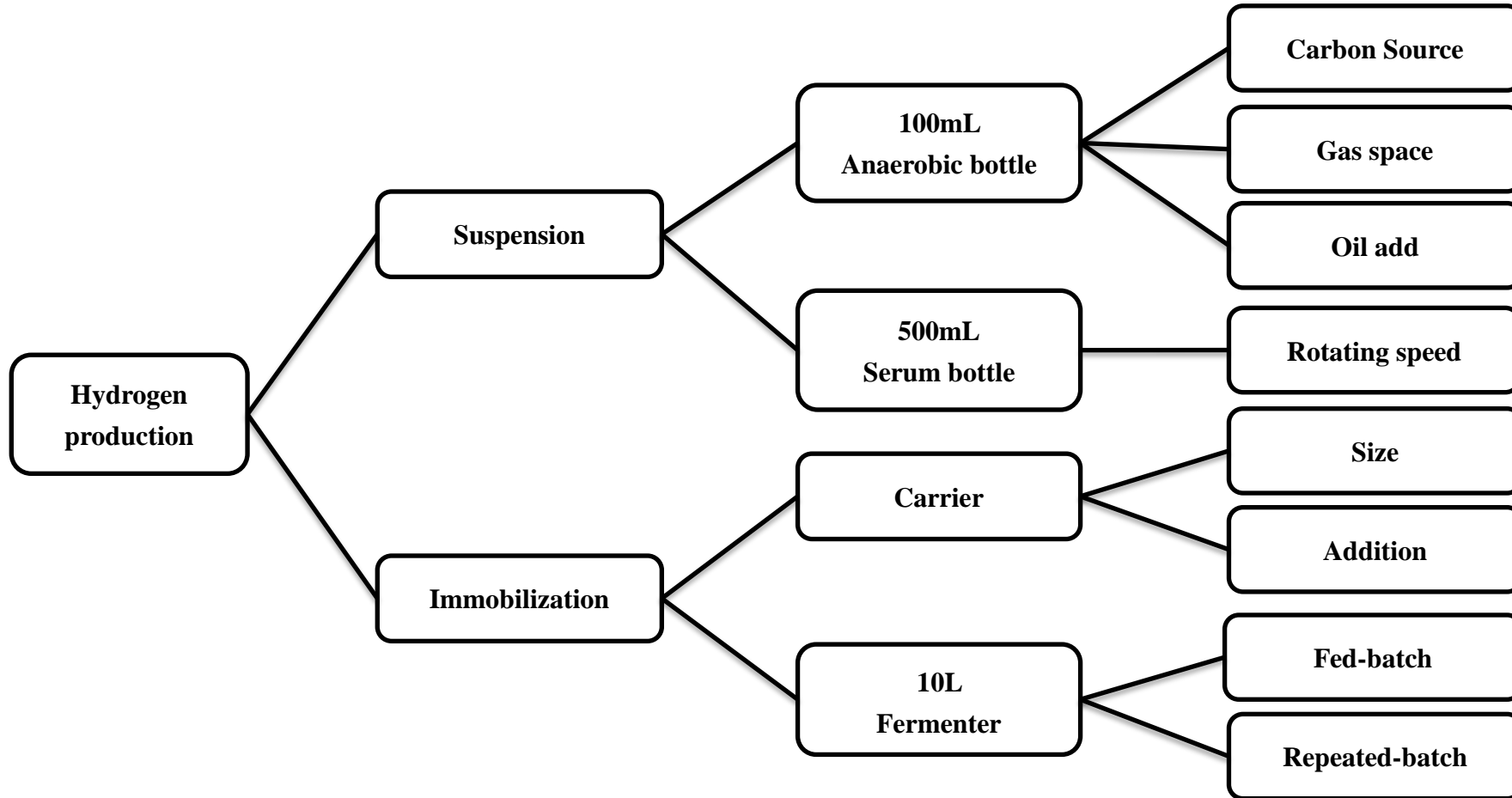
表 3.3 為本研究所使用之 Endo 培養基

Composition	Concentration (g/L)
Sucrose	20
NaHCO ₃	6.72
NH ₄ HCO ₃	5.24
K ₂ HPO ₄	0.125
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.1
MnSO ₄ · 6H ₂ O	0.015
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.025
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.005
CoCl ₂ · 5H ₂ O	0.000125
L-cystein · HCl	0.5
Sodium thioglycolate	0.5
Resazurin-2127	0.001

3.4.3 接菌

將表 3.3 依比例配置成 Endo 培養基並置入恆溫水槽一小時，待培養基溫度達到 37 °C 時，將菌體接至培養基中，接菌量為 5%。

3.5 實驗架構



3.6 懸浮菌液培養

3.6.1 探討不同碳源對產氫之影響

目的：探討不同碳源（葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖）對發酵產氫之影響。

1. 於厭氧瓶中個別配置不同碳源(葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖)之 Endo 培養基，碳源濃度為 20 g/L。
2. 以 5% 接菌量將菌體接至 Endo 培養基中。
3. 於 37°C 恆溫水槽中培養 48 小時，每 12 小時取樣分析。

3.6.2 探討不同產氣空間對產氫之影響

目的：探討不同產氣空間對發酵產氫之影響。

1. 於厭氧瓶中個別配置不同工作體積(50 mL、100 mL、150 mL)之 Endo 培養基。
2. 以 5% 接菌量將菌體接至 Endo 培養基中。
3. 於 37°C 恆溫水槽中培養 48 小時，每 12 小時取樣分析。

3.6.3 探討添加阻隔液對產氫之影響

目的：探討利用添加阻隔液阻擋氫氣回溶對發酵產氫之影響。

1. 於厭氧瓶中配置 Endo 培養基並個別添加不同體積(0 mL、5 mL、10 mL)之葵花油做為阻隔液。
2. 以 5% 接菌量將菌體接至 Endo 培養基中。
3. 於 37°C 恆溫水槽中培養 48 小時，每 12 小時取樣分析。

3.6.4 探討不同攪拌速率對產氫之影響

目的：探討不同攪拌速率對發酵產氫之影響。

1. 於血清瓶中配置 Endo 培養基並加入磁石。
2. 以 5% 接菌量將菌體接至 Endo 培養基中。
3. 將 37°C 水從恆溫水槽中打入血清瓶之夾套，設定不同轉速(0 rpm、100 rpm、200 rpm、400 rpm)，培養 48 小時，每 12 小時取樣分析。

3.7 固定化菌體培養

3.7.1 探討不同固定化載體對產氫之影響

目的：探討不同固定化載體(磚頭、活性碳、海藻酸鈉)對發酵產氫之影響。

1. 於厭氧瓶中配置 Endo 培養基並個別添加不同固定化載體(磚頭、活性碳 20 g)，海藻酸鈉與前處理之菌體混和製成固定化菌球。
2. 以 5% 接菌量將菌體接至 Endo 培養基中(磚頭、活性碳)。
3. 於 37°C 恆溫水槽中培養 48 小時，每 12 小時取樣分析。

3.7.2 探討不同固定化載體(磚頭)粒徑對產氫之影響

目的：探討不同固定化載體(磚頭)粒徑對發酵產氫之影響。

1. 於厭氧瓶中配置 Endo 培養基並個別添加不同粒徑(0.84-2 mm、2-5 mm、>5 mm)之固定化載體(20 g)。
2. 以 5% 接菌量將菌體接至上述培養基中。
3. 於 37°C 恆溫水槽中培養 48 小時，每 12 小時取樣分析。

3.7.3 探討不同固定化載體(磚頭)填充量對產氫之影響

目的：探討不同固定化載體（磚頭）填充量對發酵產氫之影響。

1. 於厭氧瓶中配置 Endo 培養基並個別添加不同填充量(10 g、20 g、30 g、40 g)之固定化載體（粒徑 2-5 mm）。
2. 以 5% 接菌量將菌體接至上述培養基中。
3. 於 37°C 恆溫水槽中培養 48 小時，每 12 小時取樣分析。

3.7.4 饋料批次發酵程序 (Fed-batch)

目的：探討饋料批次對發酵產氫之影響。

1. 前培養 500 mL 菌液，培養 36 小時。
2. 於 10 L 發酵槽中配置 Endo 培養基及填充磚頭（粒徑 2-5 mm、填充量 2 kg）。
3. 將前培養 500 mL 菌液接到 10 L 發酵槽中，在 37°C 且 pH 控制在 6 的條件下培養 48 小時，每 12 小時取樣分析。
4. 於第 48 小時饋料(濃縮碳源)，重複 3 次。

3.7.5 重複批次發酵程序 (Repeated-batch)

目的：探討饋料批次對發酵產氫之影響。

1. 前培養 500 mL 菌液，培養 36 小時。
2. 於 10 L 發酵槽中配置 Endo 培養基及填充磚頭（粒徑 2-5 mm、填充量 2 kg）。

3. 將前培養 500 mL 菌液接到 10 L 發酵槽中，在 37°C 且 pH 控制在 6 的條件下培養 48 小時，每 12 小時取樣分析。
4. 於第 48 小時洩料、饋料(Endo 培養基)，重複 3 次。



圖 3.2 10 L 厭氧固定化培養系統

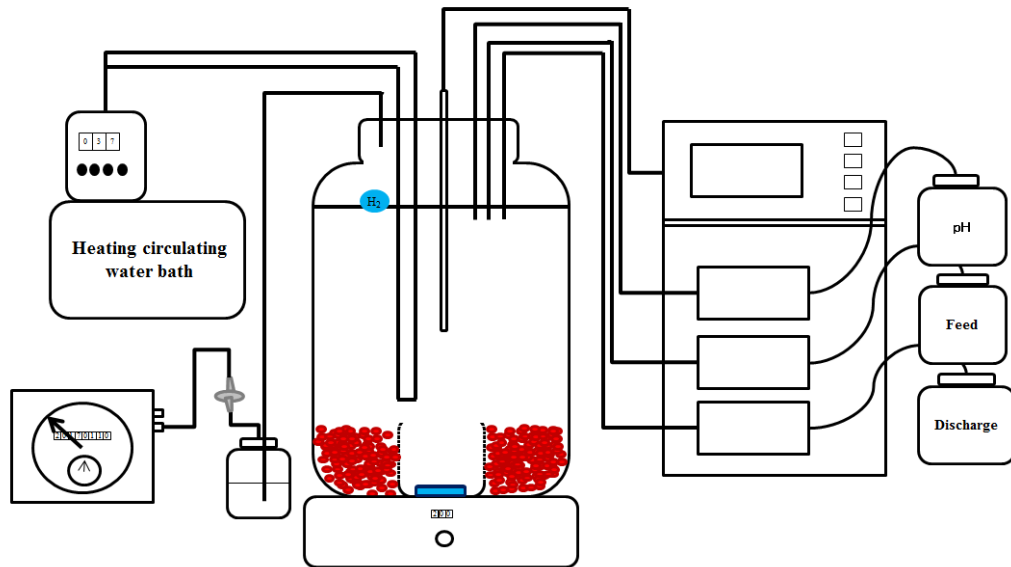


圖 3.3 10 L 厭氧固定化培養系統(繪圖)

第四章 結果與討論

4.1 懸浮菌液培養

4.1.1 探討不同碳源對產氫之影響

本次實驗探討不同碳源，蔗糖、葡萄糖、果糖、乳糖對 *C. pasteurianum* 發酵產氫之影響。實驗結果如圖 4.1，以蔗糖為碳源有較高的氫氣產量如圖 4.2，而葡萄糖、果糖、乳糖發酵產氫量明顯低很多如圖 4.3、圖 4.4、圖 4.5。另外有做一組混糖系統的實驗，將原本 20 g/L 的純蔗糖改成 5 g/L 蔗糖加上 15 g/L 的葡萄糖，發酵產氫量有明顯的提升，但還是遠不及純蔗糖(20 g/L)的產量，故選用蔗糖作為主要碳源進行發酵生產。實驗結果與文獻相符，蔗糖為菌體生長最佳碳源 (Yung-Chung Lo et al., 2008)，菌體生長情形如圖 4.6。

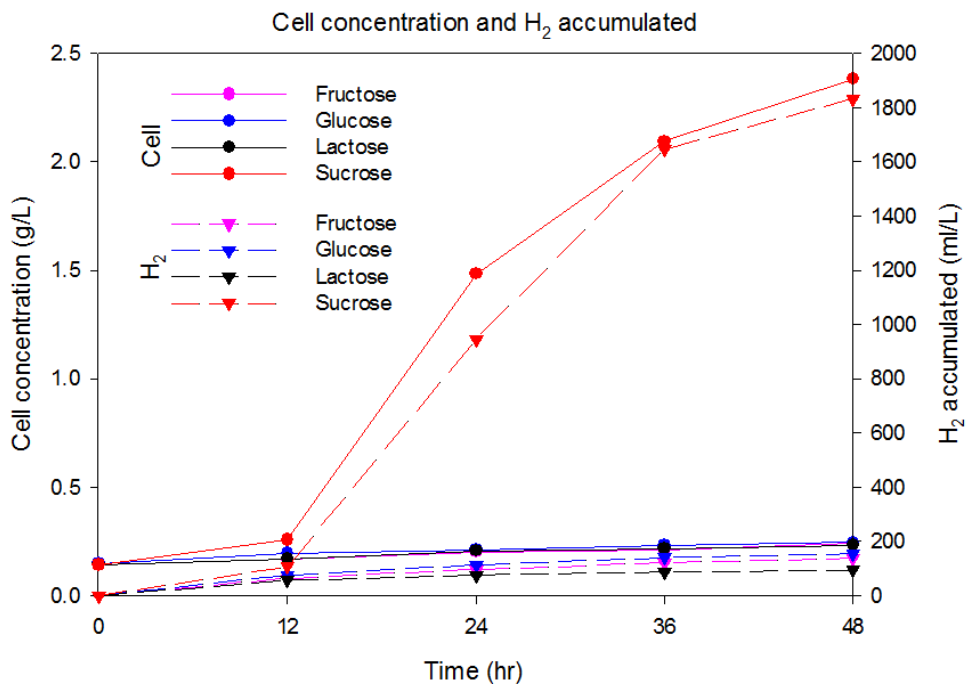


圖 4.1 不同碳源氫氣累積量與菌體濃度比較

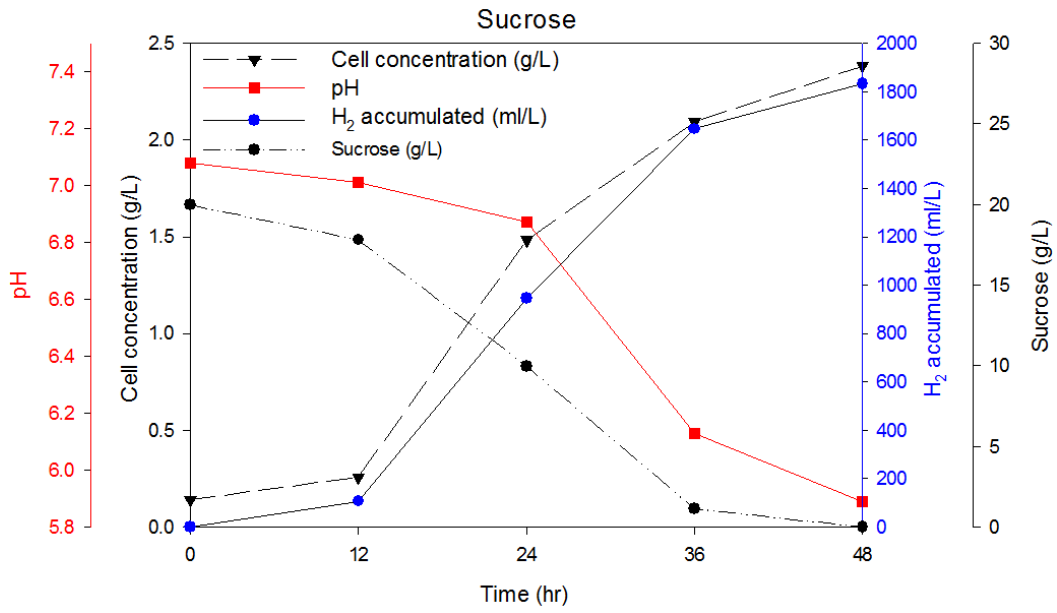


圖 4.2 蔗糖氫氣累積量與菌體濃度

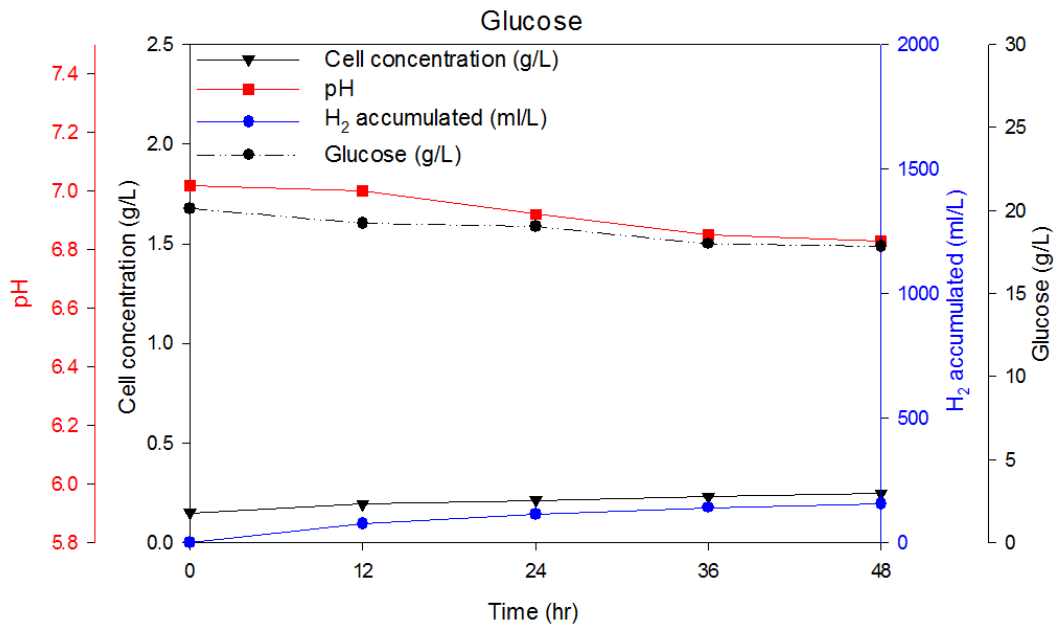


圖 4.3 葡萄糖氫氣累積量與菌體濃度

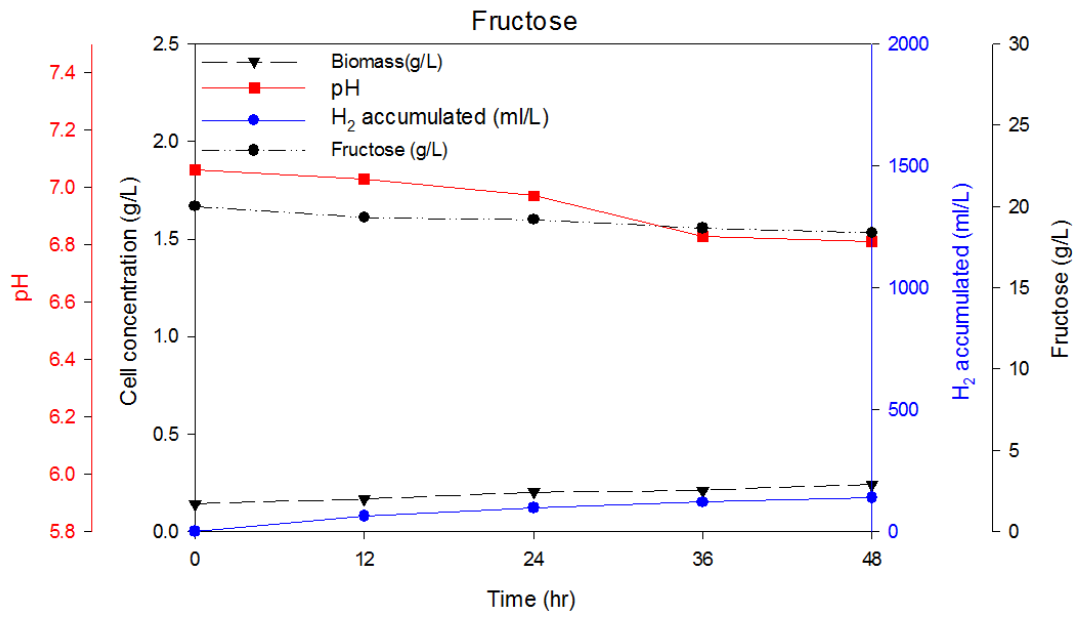


圖 4.4 果糖氫氣累積量與菌體濃度

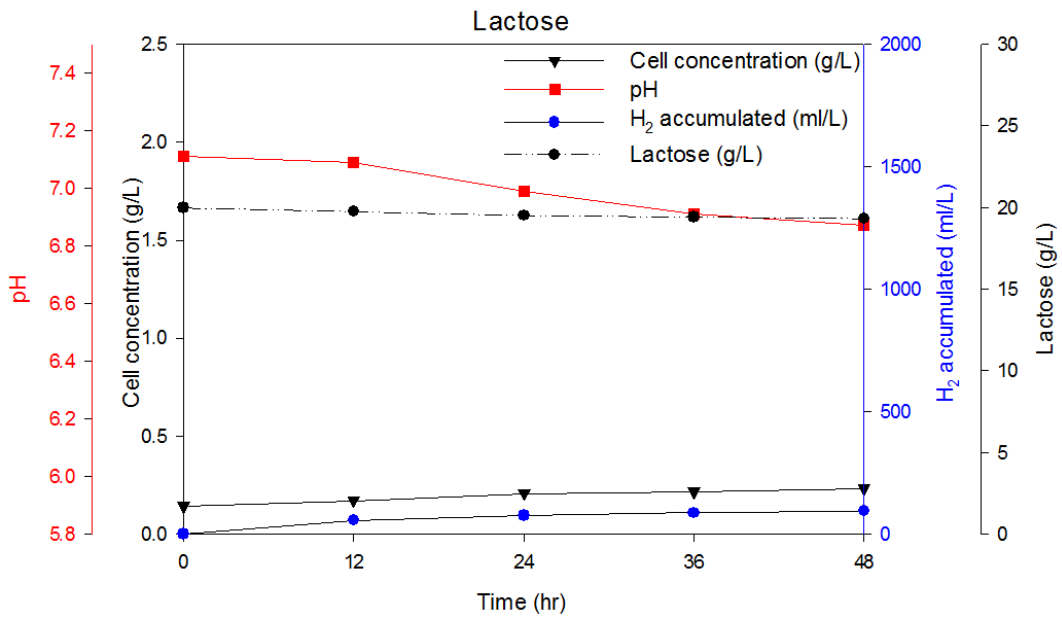


圖 4.5 乳糖氫氣累積量與菌體濃度

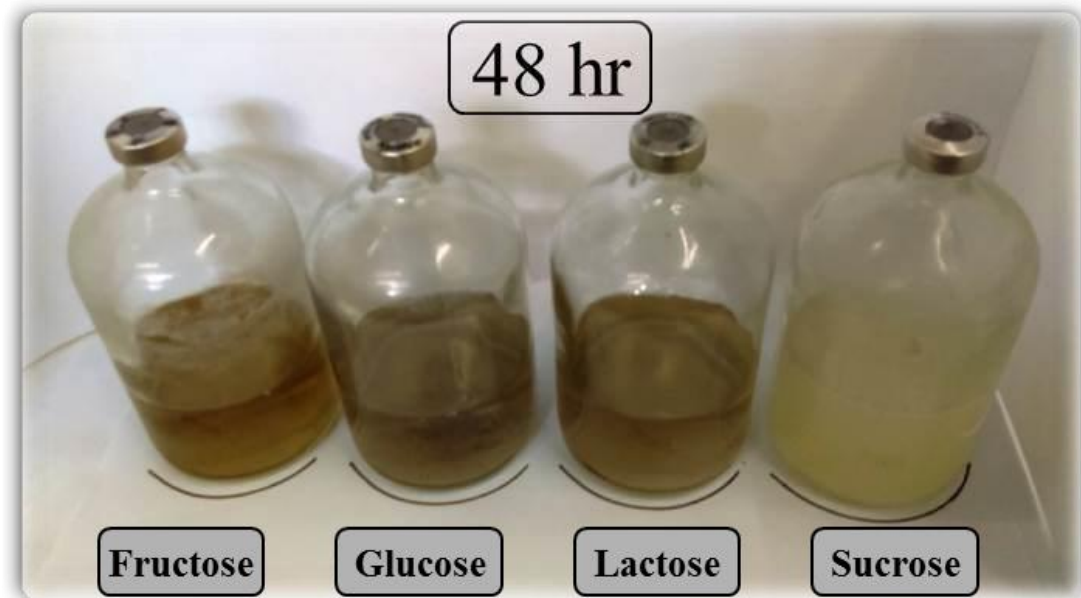


圖 4.6 不同碳源菌體生長情形

4.1.2 探討不同產氣空間對產氫之影響

本次實驗探討不同產氣空間對 *C. pasteurianum* 發酵產氫之影響。實驗結果如圖 4.7，不同工作體積(50 mL、100 mL、150 mL)之產氣空間為 170 mL (Big)、120 mL (Medium)、70 mL (Small)。產氣空間太小瓶裡的壓力太大會導致抑制現象的產生，產氣有停滯轉向酸發酵的現象，與文獻結果相符(白明德，2002)。故為了減輕瓶內分壓產生的抑制轉向，在培養時需將氣體排出發酵槽。

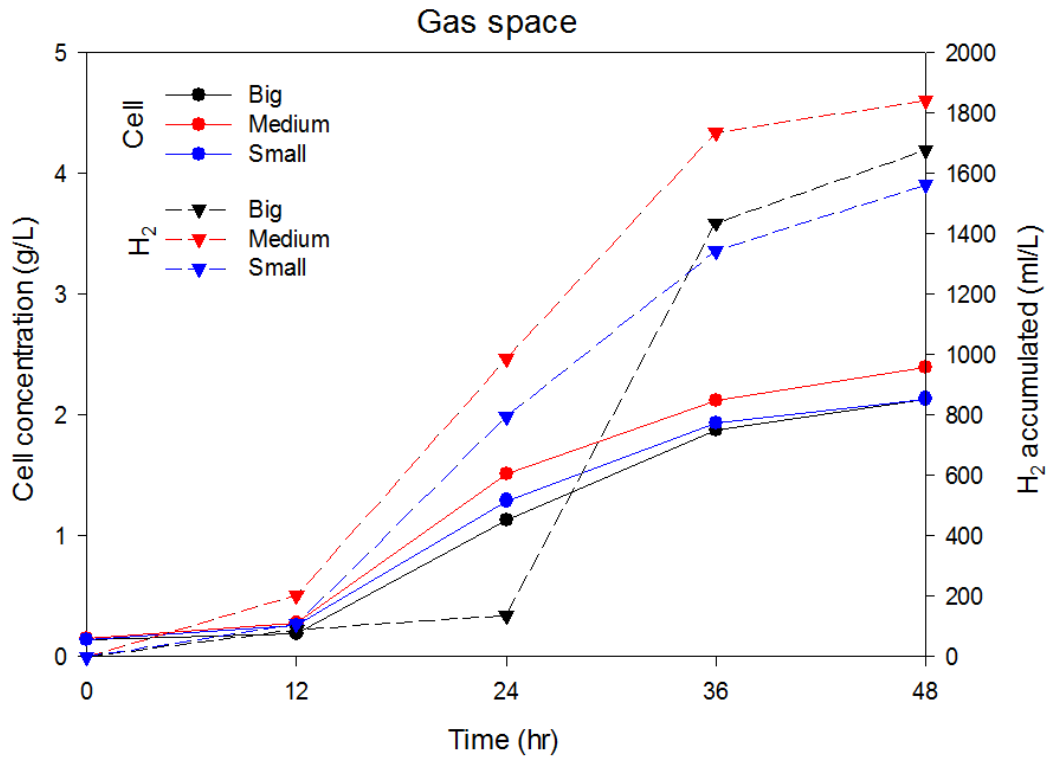


圖 4.7 不同產氣空間氫氣累積量與菌體濃度比較



圖 4.8 不同產氣空間菌體生長情形

4.1.3 探討添加阻隔液對產氫之影響

本次實驗探討添加阻隔液阻擋氫氣回溶對 *C. pasteurianum* 發酵產氫之影響。實驗結果如圖 4.9，添加不同體積(0 mL、5 mL、10 mL)之阻隔液雖然能對氫氣回溶有些許影響，但對總體產氫並沒有太大的影響。

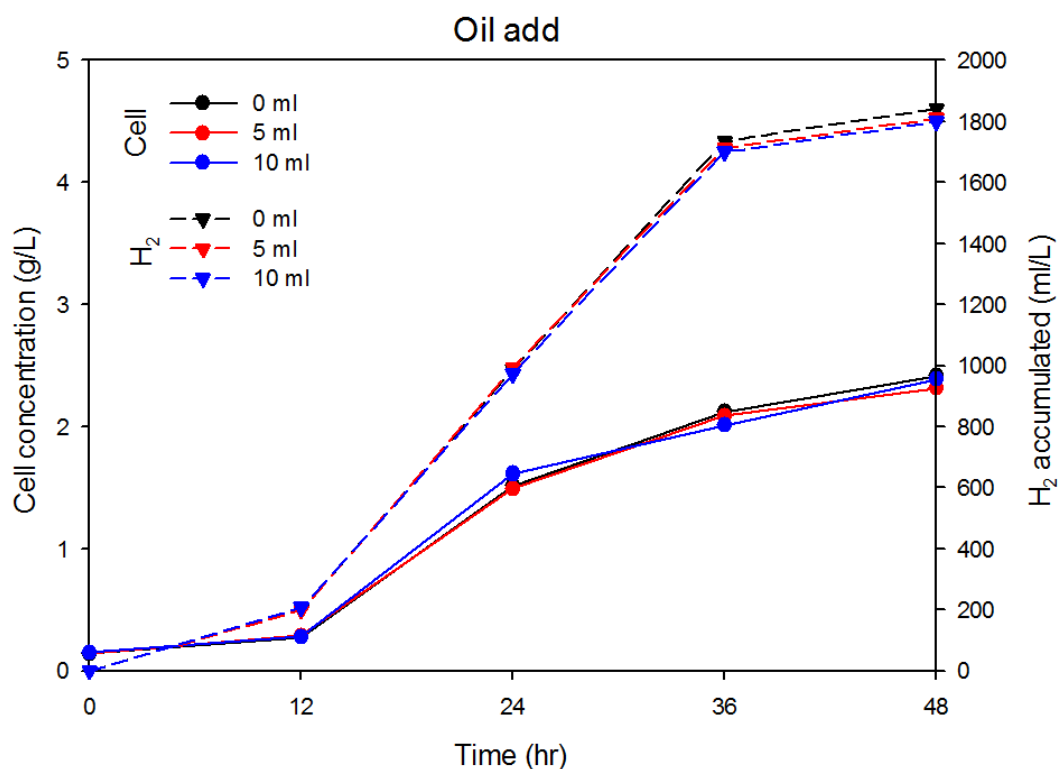


圖 4.9 添加不同體積之阻隔液對氫氣累積量與菌體濃度比較

4.1.4 探討不同攪拌速率對產氫之影響

本次實驗探討不同攪拌速率(0 rpm、100 rpm、200 rpm、400 rpm)對 *C. pasteurianum* 發酵產氫之影響。實驗結果如圖 4.10、4.11，攪拌能增加菌體生長速率及氣體生產量，推測攪拌可均勻混合培養基與菌體，但若攪拌速率過高，剪切力過大不利於菌體生長，其中又以轉速 200 rpm 有最佳產量，故將最佳轉速定為 200 rpm。

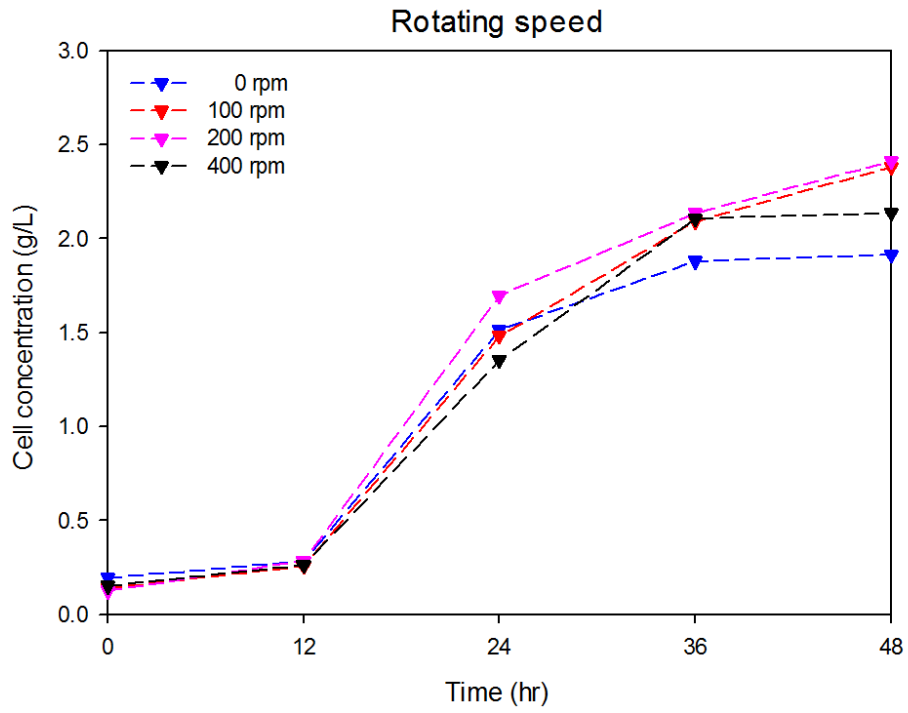


圖 4.10 不同攪拌速率對體濃度之影響

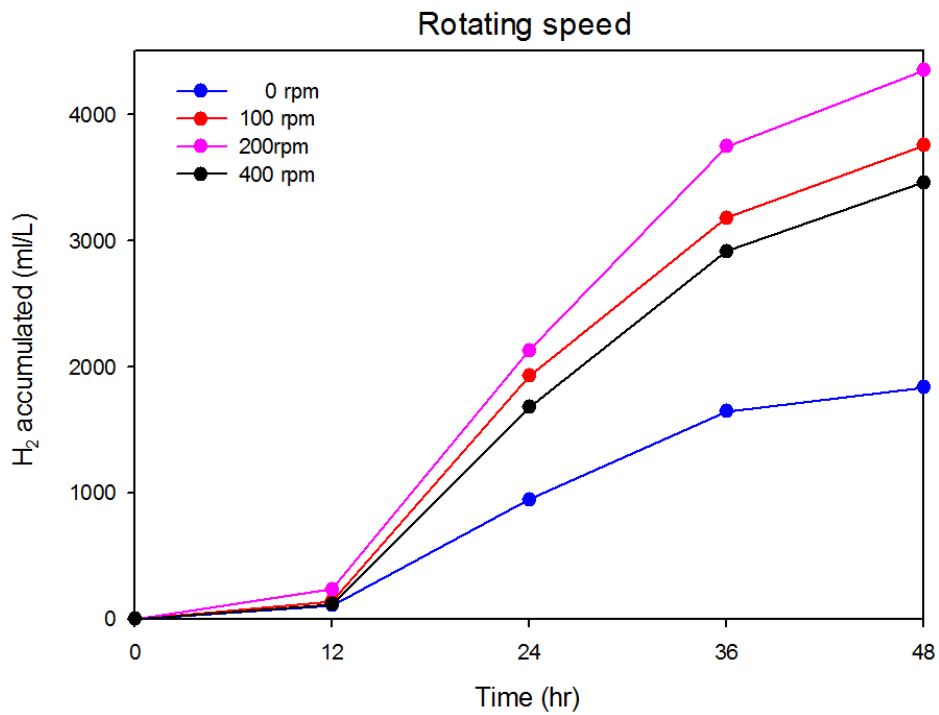


圖 4.11 不同攪拌速率對氫氣累積量之影響

4.2 固定化菌體培養

4.2.1 探討不同固定化載體對產氫之影響

本次實驗探討不同固定化載體(磚頭、活性碳、海藻酸鈉)對 *C. pasteurianum* 發酵產氫之影響,由圖 4.12 可看出以海藻酸鈉當固定化載體無法成功活化菌體,推測可能以海藻酸鈉作為載體的質傳效果不佳,導致菌體無法活化。以活性碳作為載體的效果也不佳,且活性碳太輕容易浮於液體表面,也易造成培養基混濁導致量測菌體量困難。以磚頭當作固定化載體不但價格便宜且容易取得,對氫氣產量也有不錯的效果,故選用磚頭作為固定化載體,圖 4.13、圖 4.14 為菌體生長於磚頭表面之 SEM 圖,從圖中可看出菌體大量生長於磚頭上。

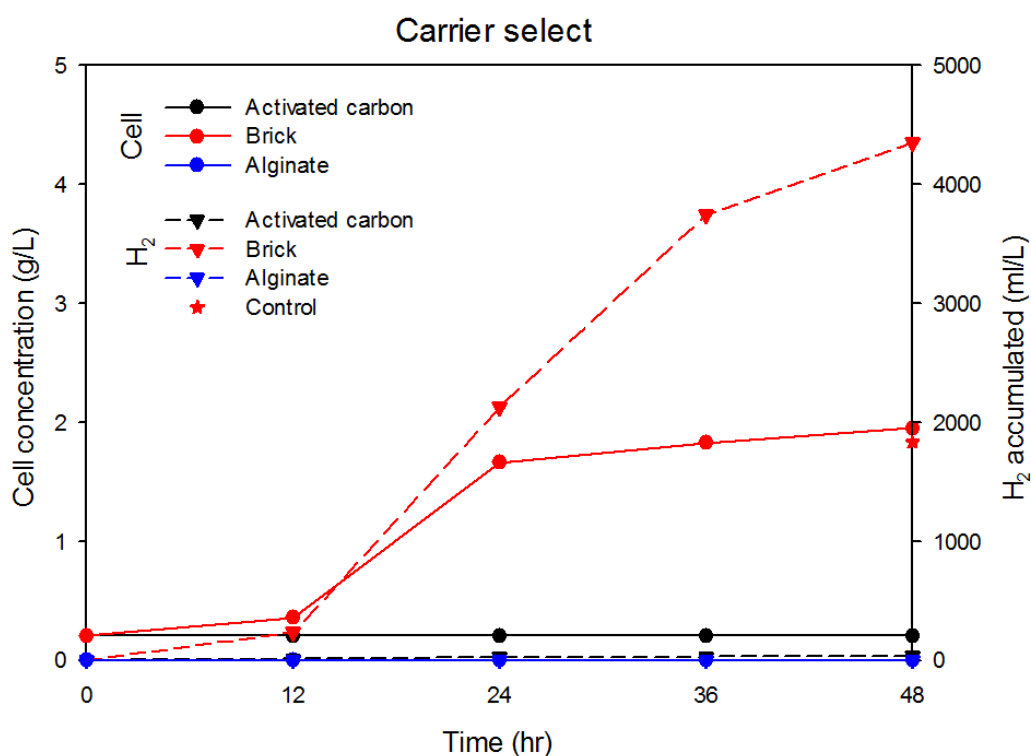


圖 4.12 不同固定化載體對氫氣累積量與菌體濃度比較

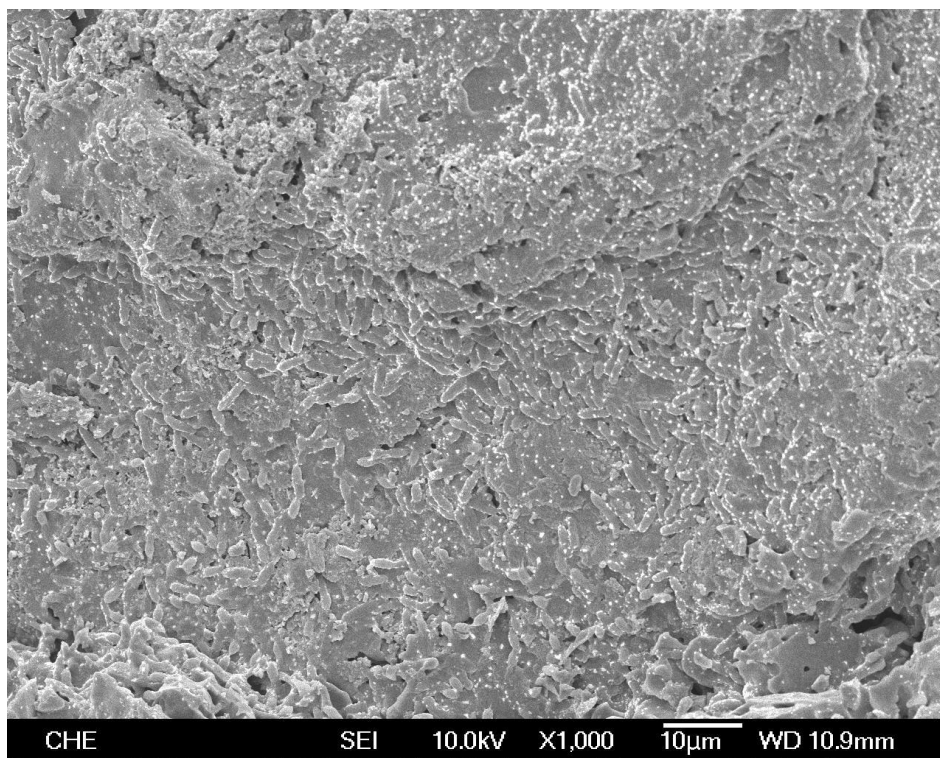


圖 4.13 菌體生長於磚頭上之 SEM 圖(X 1,000)

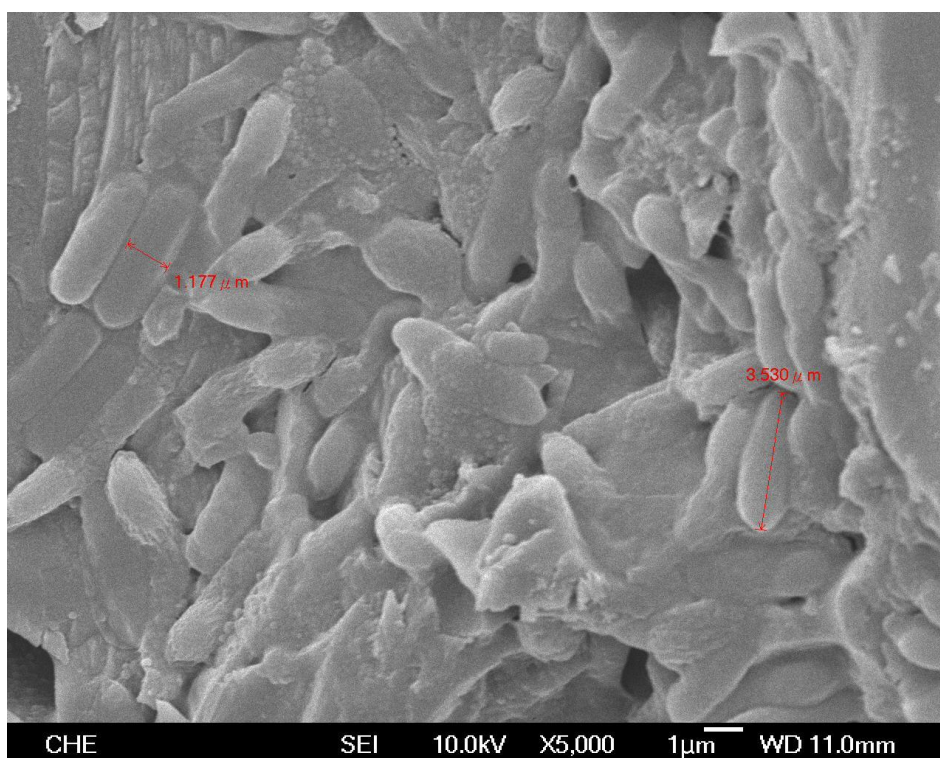


圖 4.14 菌體生長於磚頭上之 SEM 圖(X 5,000)

4.2.2 探討不同固定化載體(磚頭)粒徑對產氫之影響

本次實驗探討不同固定化載體（磚頭）粒徑對 *C. pasteurianum* 發酵產氫之影響，以下將三種不同粒徑 0.84-2 mm、2-5 mm 和 >5 mm，稱為 Small(0.84-2 mm)、Medium(2-5 mm)、Large(>5 mm)。實驗結果如圖 4.15，在 36 小時可以看到累積氫氣產量在粒徑在 Medium 時有最高產量；粒徑 Large 略低於粒徑 Medium；而粒徑在 Small 下，累積氫氣產量偏低。以殘餘蔗糖量來看，Small 有大量蔗糖剩餘；而 Medium 及 Large 蔗糖量幾乎消耗完畢。再以酸類產物濃度量來看，Medium 與 Large 之乙酸、丁酸濃度明顯高於 Small。此與文獻中指出，菌體先經由產氫階段，待消耗大部分碳源，才開始進入產酸階段相符 (Bahl et al.,1982)。故推測原因為粒徑 Large 總表面積較 Medium 小，能固定化的孔洞也較少；而 Small 因粒徑過小、顆粒間堆積緊密，培養基中營養物質流動性較差，導致菌體生長速度慢，發酵產氫速度也較慢。故選擇 Medium(2-5 mm)為最佳粒徑。

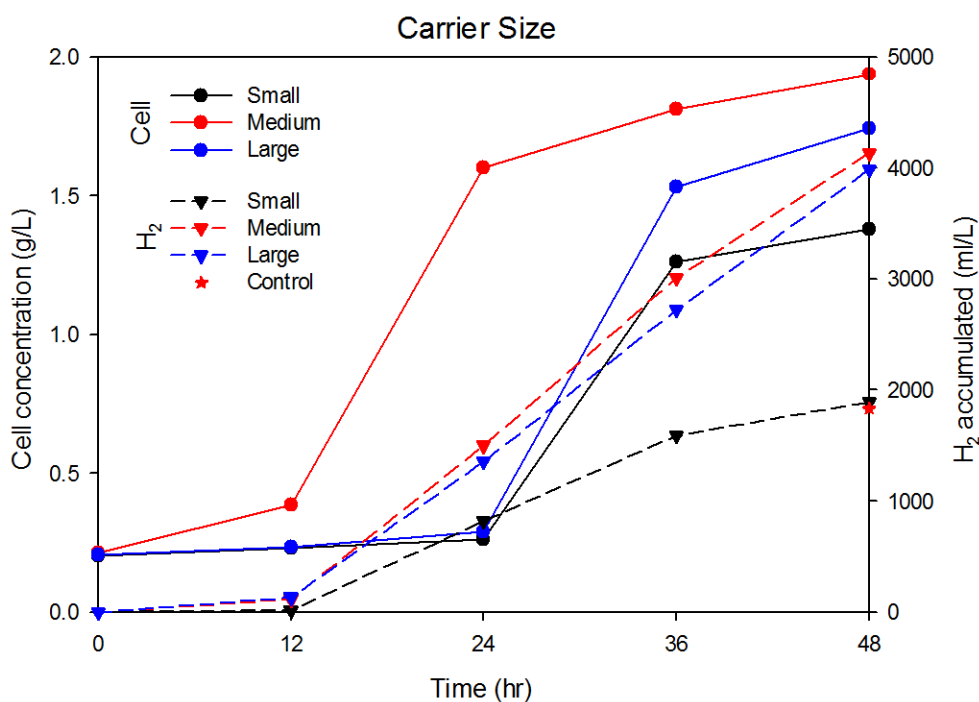


圖 4.15 不同粒徑之載體對氫氣累積量與菌體濃度比較

4.2.3 探討不同固定化載體(磚頭)填充量對產氫之影響

本次實驗探討不同固定化載體（磚頭）填充量對 *C. pasteurianum* 發酵產氫之影響，由圖(圖 4.16、圖 4.17)中可看出雖然沒有固定化測出來的 Biomass 較高，但氫氣累積量有固定化的菌體明顯高出許多，推測有許多菌體因吸附於載體的孔洞中，所以無法測出正確的 Biomass 值，其中又以固定化載體填充量 200 g/L 的氫氣累積量最高，故選用 200 g/L 為最佳填充量，圖 4.18 為不同固定化載體填充量菌體生長情形，因菌體生長於固定化載體，且會有大量菌體沉澱，故無法準確測量出菌體濃度。

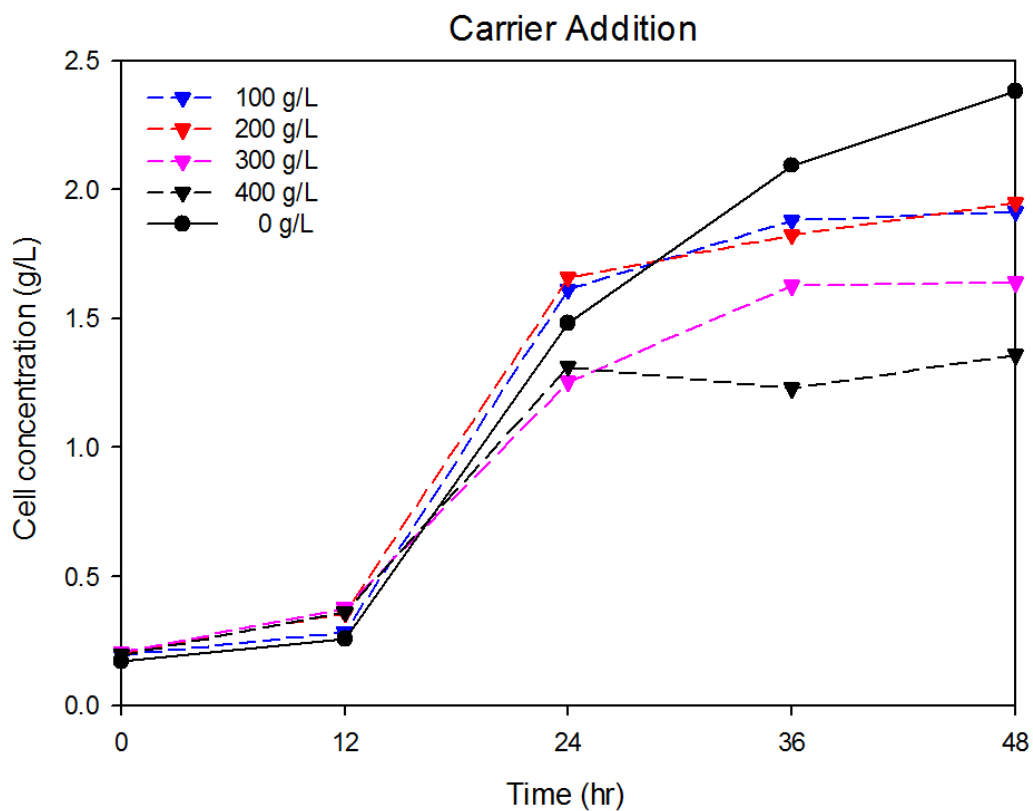


圖 4.16 不同固定化載體填充量對體濃度之影響

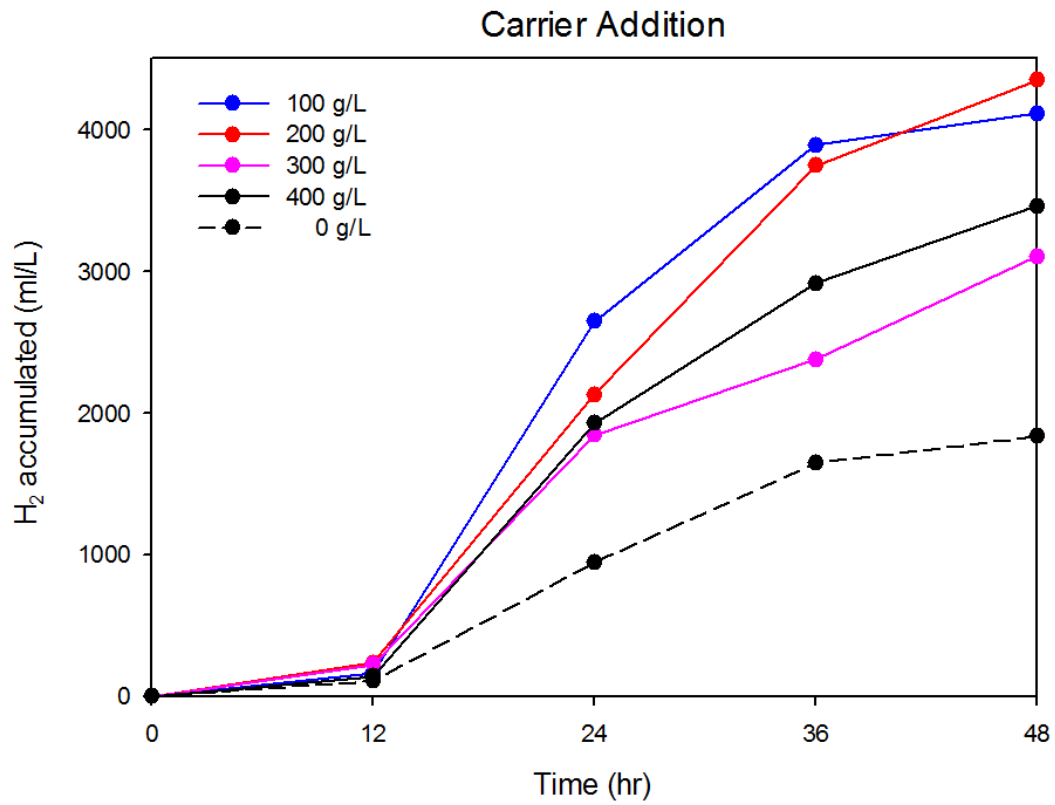


圖 4.17 不同固定化載體填充量對氫氣累積量之影響



圖 4.18 不同固定化載體填充量菌體生長情形

4.2.4 饋料批次發酵程序 (Fed-batch)

本次實驗探討饋料批次發酵程序對 *C. pasteurianum* 發酵產氫之影響，從前面的實驗可以發現大概在第 48 小時停止產氫，蔗糖量分析結果可以看出已將碳源吃完，故在第 48 小時饋料濃縮碳源進入發酵槽中。由圖 4.19 可發現在第三次饋料時氫氣累積量的斜率趨近平緩，推測可能是後期產生的乙酸跟丁酸與調控 pH 的氫氧化鈉反應成乙酸鹽跟丁酸鹽，造成發酵槽內的鹽度過高，影響菌體生長，不利於氫氣的生產。

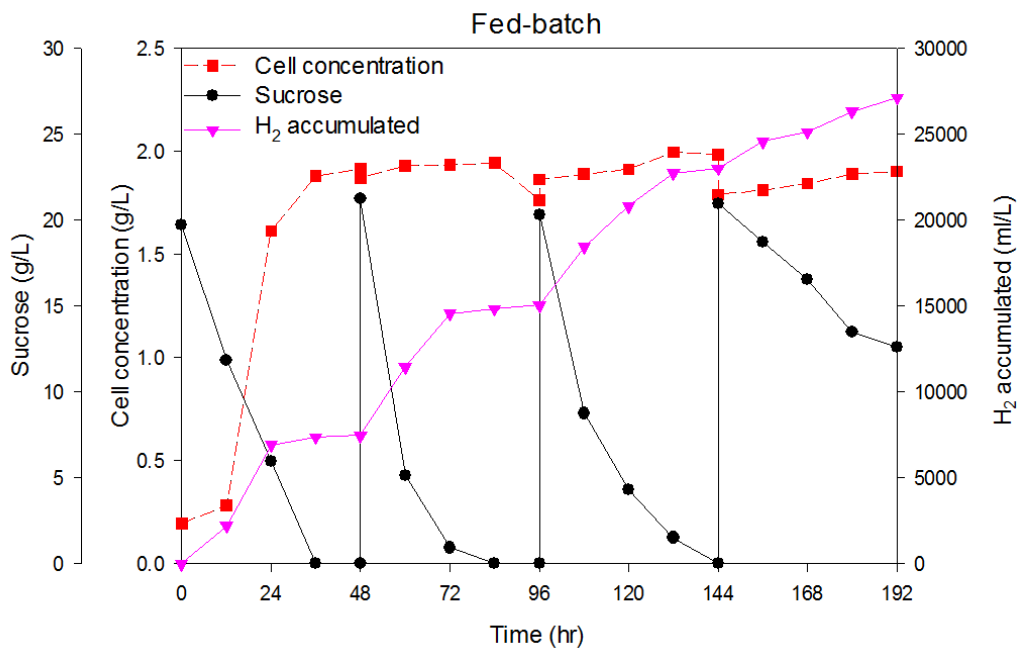


圖 4.19 饋料批次發酵程序生長曲線圖

4.2.5 重複批次發酵程序 (Repeated-batch)

本次實驗探討重複批次發酵程序對 *C. pasteurianum* 發酵產氫之影響，由圖 4.20 中可以看出氫氣累積量呈穩定的增加，斜率並不會隨著重複批次的次數增加而趨向於平緩，推測在洩料時把不利於氫氣累積的乙酸、丁酸及鹽類排出發酵槽，當重新饋料時可以使菌體能正常的生長。

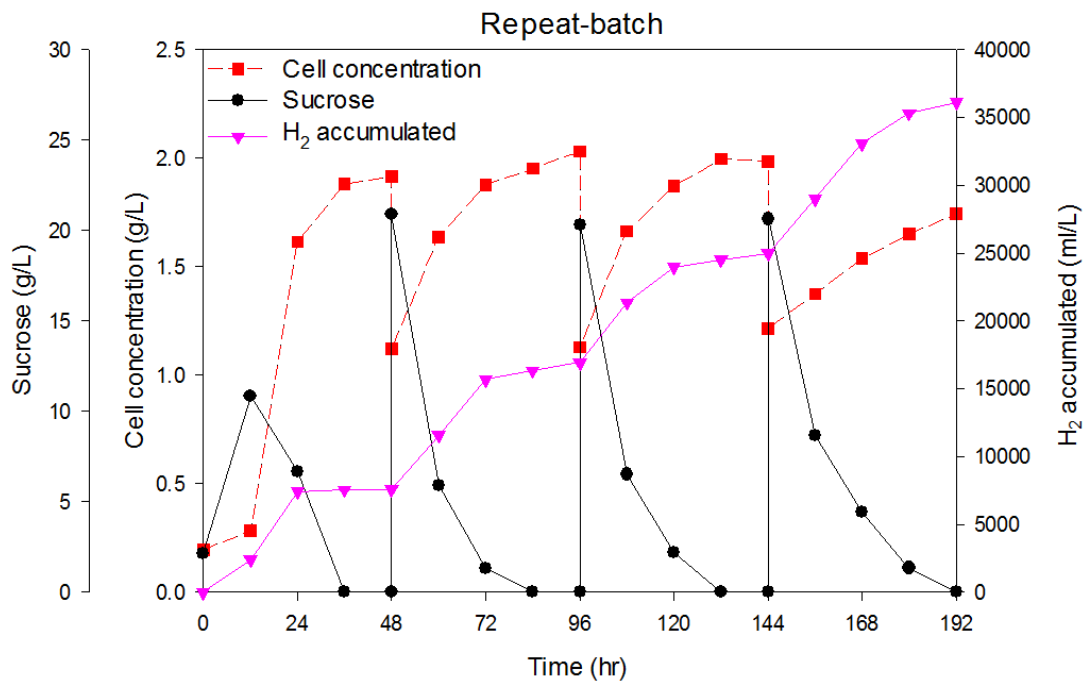


圖 4.20 重複批次發酵程序生長曲線圖

表 4.1 氫氣產量與文獻之比較

Immobilized	Carbon source	H ₂ content (%)	Yield (mol H ₂ /mol sucrose)	Reference
Ca-Alg ^a	Sucrose	43	1.65	謝家琦，2003
SC-AC ^b	Sucrose	39	1.63	謝家琦，2003
SC-細沙 ^c	Sucrose	25	1.01	謝家琦，2003
PVA ^d	Sucrose	42	1.68	謝家琦，2003
EVA ^e	Sucrose	36	1.74	謝家琦，2003
N/A ^f	Sucrose	55.2	3.15	Yung-Chung Lo et al., 2008
N/A ^f	Glycerol	44	0.627	Shyamali et al., 2001
N/A ^f	Sucrose	47	1.68	This study
Brick	Sucrose	51	3.06	This study

^aCa-Alg：活性碳-藻酸鈣顆粒；^bSC-AC：Silicon-活性碳顆粒；^cSC-細沙：Silicon-細沙顆粒；^dPVA：聚乙醇醇顆粒；^eEVA：乙烯-醋酸乙烯酯顆粒；^fN/A：無固定化(懸浮菌液)

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

1. 在碳源的選擇方面，乳糖、果糖及葡萄糖雖然能藉由添加蔗糖來提高氫氣產量，但還是不及蔗糖作為碳源進行發酵產氫，與文獻結果相符，以蔗糖作為碳源有最佳產氫量(Yung-Chung Lo et al., 2008)。
2. 產氣空間方面若空間太小，氫氣分壓過大會抑制氫氣的生產，不利於氫氣累積，空間過大容易有氧氣的殘留，若要達到充分厭氧狀態要消耗更多的氫氣來趕氧，使成本提高，但若是不斷地將產出氣體排掉減少氫氣分壓，能減少抑制作用的產生，實驗結果與文獻相符(白明德，2002)。
3. 添加阻隔液方面，有無添加阻隔液對氫氣累積產量並無太大影響，考慮實驗成本選擇不添加。
4. 攪拌速率方面，氫氣累積量在有攪拌培養下明顯增高許多，與文獻提到攪拌能增加產氫速率相符，但攪拌太快，剪切力太大不利於菌體生長，故選用 200 rpm 作為最佳攪拌速率(Yung-Chung Lo et al., 2008)。
5. 在載體種類的選擇方面，海藻酸鈉對菌體生長與產物生成有質傳上的傳遞困難；而活性炭在培養基中容易漂浮於液面上且容易產生小碎屑，不利菌體生長及測量；磚頭當固定化載體可以讓菌體正常生長且能提高氫氣累積量，由於磚頭較易沉澱，故選為最優良之固定化載體。
6. 在磚頭粒徑與填充量方面，粒徑越大或者填充量越多時，質傳效果差，導致氫氣累積量較低；因此粒徑越小或者填充量少時，氫氣累積量較高，但若顆粒太小時容易浮在培養基上面。

7. 饋料批次發酵實驗會累積大量鹽分，使培養基鹽度提高，不利於菌體生長，使氫氣累積量下降。
8. 重複批次發酵實驗顯示，以磚頭為固定化載體加上攪拌，有良好的重複使用效果，且氫氣累積量也明顯提高很多。

5.2 未來展望

1. 使用混菌串聯系統，例如使用農業廢棄物 (Waste) 與木質纖維 (Lignocellulose) 來取代蔗糖，將產氫菌與纖維分解細菌共培養以供給碳源；與綠藻串聯代謝所產生的二氧化碳，避免發酵程序發生與民爭食與排放溫室氣體之隱憂。
2. 本研究發現固定化與攪拌能提升氫氣之生產累積速率，因此持續改善不同的固定化方式與載體與來提升氫氣生產速率是有其可行性的。
3. 研究中發現若從發酵槽中將反應生成的鹽類取出可使氫氣生產速率不會往下掉，故爾後可進行連續式培養策略。

參考文獻

- 白明德、鄭幸雄 (2002)，厭氧氫發酵程序中氫分壓的影響與重要性，第 27 屆廢水研討會。
- 李瑞真 (2011)，固定化 *Clostridium acetobutylicum* 進行連續式發酵生產丁醇之研究，私立東海大學化學工程與材料工程所碩士論文。
- 劉奕廷 (2006)，利用本土細菌生產幾丁質酶之研究，國立成功大學化學工程所碩士論文。
- 林祺能 (2002)，固定化細胞產氫，逢甲大學化學工程所碩士論文。
- 賴奇厚 (2002)，營養鹽對厭氧產氫之影響，逢甲大學土木及水利工程所碩士論文。
- 黃俊銓 (2011)，利用本土菌株 *Clostridium pasteurianum* CH₄ 進行以甘油為碳源之連續式丁醇發酵，高苑科技大學化工與生化工程所碩士論文。
- 黃政賢、林信一、蔡瀛逸、謝炎恭 (2000) 以不同基質及培養方式探討厭氧消化產氫之初期研究，第二十五屆廢水處理技術研討會論文集，雲林：國立雲林科技大學。
- 謝家琦 (2003)，以合成高分子膠體固定化細胞進行填充床系統發酵產氫，逢甲大學化學工程所碩士論文。
- 靳叔彥 (1998) 本世紀世界能源問題和二十一世紀世界能源展望，*能源季刊*，56-61。
- 周世凱、許梅娟 (2009)，新能源—生物產丁醇，*科學發展*，433:26-31。

曾重仁 (1998), 氫能源技術簡介, *太陽能學刊*, 第 3 卷, 第 2 期, 9-11。

曾怡禎、許恆維、施翠盈、劉憶芬 (2000) 本土性梭菌屬產氫菌株之生理現象, *國科會生物產氫研究成果發表會論文集*, 台南市。

吳建一、鍾宛真、葉修鋒 (2006) 固定化酵素之演進與展望, *化工*, 175-198。

Alessandro Gallazzi., Barbora Branska., Flavia Marinelli., Petra Patakova. (2015) .Continuous production of n-butanol by *Clostridium pasteurianum* DSM525 using suspended and surface-immobilized cells. *Journal of Biotechnology*. 216:29-35.

Bahl H., Andersch W., Gottschalk G. (1982). Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 15:201-205.

Bahl H., Andersch W., Braun K., Gottschalk G. (1982). Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 14:17-20.

Benemann JR., Berenson JA., Kaplan NO., Kamen MD. (1973). Hydrogen evolution by a chloroplast-ferredoxin-hydrogenase sstem. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:2317-2320.

Chieh-Hung Liu., Chin-Yen Chang., Chieh-Lun Cheng., Duu-Jong Lee., Jo-Shu Chang. (2012) .Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CGS5 using carbohydrate-rich microalgal biomass as feedstock. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37:15458-15464.

- Chieh-Lun Cheng., Yung-Chung Lo., Kuo-Shing Lee., Duu-Jong Lee., Chiu-Yue Lin., Jo-Shu Chang. (2011) .Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. *Bioresource Technology*. 102:8514-8523.
- Chiu-Yue Lin., Chyi-How Lay., Biswarup Sen., Chen-Yeon Chu., Gopalakrishnan Kumar., Chin-Chao Chen., Jo-Shu Chang. (2012) . Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37:15632-15642.
- Das D, Veziroglu T. N. (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*. 26:13-28.
- David B. Levina., Lawrence Pitt., Murray Love. (2004) .Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*. 29:173-185.
- Debabrata Das., T. Nejat Veziroglu. (2001) .Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*. 26:13-28.
- Fascetti, E., and Todini, O. (1995). Rhodobacter sphaeroides RV Cultivation and Hydrogen Production in a One- and Two-Stage Chemostat. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44: 300.
- Ferchichi, M., Crabbe, E., Hintz, W., Gill, G. H. Almadidy, A. (2005). Influence of culture parameters on biological hydrogen production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 21:855-862.
- Franks, A.H., Harmsen, H.J., Raangs, G.C., Jansen, G.J., Schut, F., Welling, G.W. (1998). Variations of Bacterial Populations in Human Feces Measured by

- Fluorescent in Situ Hybridization with Group-Specific 16s rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3336-3345.
- Gryta M. (2002). The assessment of microorganism growth in the membrane distillation system. *Desalination*, 142:79-88.
- Jaegle L., Steinberger L., Martin R. V. Chance K. (2005). Global partitioning of NO_x sources using satellite observations: Relative roles of fossil fuel combustion, biomass burning and soil emissions. *Faraday Discuss.* 130:407-423.
- Jianlong Wang., Wei Wan. (2009) .Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34:799-811.
- Jiann-Shin Chen., Leonard E. (1974) .Purification and properties of Hydrogenase from *Clostridium Pasteurianum* W5. *Biochimica et Biophysica Acta*. 371:283-298.
- Kosourov, S., Tsygankov, A., Seibert, M., Ghirardi, M.L. (2002). Sustained Hydrogen Photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: Effects of Culture Parameters. *Biotechnology and Bioengineering* 78: 731-740.
- Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I. M., Marchant R., Koutinas A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21:377-397.
- Kovacs, A. T., Rakhely, G., Balogh, J., Maroti, G., Fulop, A., Kovacs, K. L. (2005). Anaerobic regulation of hydrogenase transcription in different bacteria. *Biochemical Society Transactions*. 33, 1.
- Lay J., Lee Y., Noike Tatsuya. (1999). Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste, *Vol.* 33, No. 11:2579-2586.
- Lars Regestein., Eric Will Doerr., Antje Staden., Lars Rehm. (2015) .Impact of

- butyric acid on butanol formation by *Clostridium pasteurianum*. *Bioresource Technology*. 196:153-159.
- Lebeau T., Jouenne T., Junter G. (1998). Diffusion of sugars and alcohols through composite membrane structures immobilising viable yeast cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 22:434-438.
- Lee JW, Greenbaum E. (2005). A new perspective on hydrogen production of photosynthetic water splitting. *Washington:ACS*. Vol. 666, 209-22.
- Levin, D.B., Pitt, L., Murray, L. (2004). Biohydrogen Production: Prospects and Limitations to Practical Application. *International Journal of Hydrogen Energy* 29: 173-185.
- Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M.L., Seibert, M. (2000). Sustained Photobiological Hydrogen Gas Production Upon Reversible Inactivation of Oxygen Evolution in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 122: 127-136.
- Miyake, J., Kawamura, S. (1987). Efficiency of Light Energy Conversion to Hydrogen by the Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy* 12: 147-149.
- Miyake, J., Miyake, M., Asada, Y. (1999). Biotechnological Hydrogen Production: Research for Efficient Light Energy Conversion. *Journal of Biotechnology* 70: 89-101.
- Ni, M., Leung, D.Y.C., Leung, M.K.H., Sumathy, K. (2006). An Overview of Hydrogen Production from Biomass. *Fuel Processing Technology* 87: 461-472.
- Pilkington P. H., Margaritis A., Mensour N. A., and Russell I. (1998). Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. *Journal of*

the Institute of Brewing, 104:19-31.

Prazmowski. (1880). Untersuchung über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterien-Aeten. Inaug. Diss. Hugo Voigt, Leipzig, 1-58.

Ramachandran R., Menon R. K. (1998). An overview of industrial uses of hydrogen. *Energy*, 23:593-598.

Satish Kumar Ainala., Eunhee Seol., Jung Rae Kim., Sunghoon Park.(2016).Effect of culture medium on fermentative and CO-dependent H₂ production activity in *Citrobacter amalonaticus* Y19. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41:6734-6742.

Shireen Meher Kotay., Debabrata Das. (2008) .Biohydrogen as a renewable energy resource—Prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33:258-263.

Shyamali Sarma., Vikash Kumar Dubey., Vijayanand S. Moholkar. (2016) .Kinetic and thermodynamic analysis (with statistical optimization) of hydrogen production from crude glycerol using *Clostridium pasteurianum*. *International Journal of Hydrogen Energy*.1-18.

Suzuki, Y. (1982). On Hydrogen as Fuel Gas. *International Journal of Hydrogen Energy* 7: 227-230.

Sveshnikov, D.A., Sveshnikova, N.V., Rao, K.K., Hall, D.O. (1997). Hydrogen Metabolism of Mutant Forms of *Anabaena Variabilis* in Continuous Cultures and under Nutritional Stress. *FEMS Microbiology Letters* 147: 297-301.

Takeshima M., Kimata T., Mori N., Emori H. (1993). Pegasus an innovative high-rate BOD and nitrogen removal process for municipal wastewater. 66th WEF Annual

Conference.

Thomas D., Michael T., John M., Jack P. (1994). *Biology of Microorganisms. Seventh edition.* 77-80.

Veziroglu T. N.(1995). Twenty years of the hydrogen movement. *Energy*, 20:1-7.

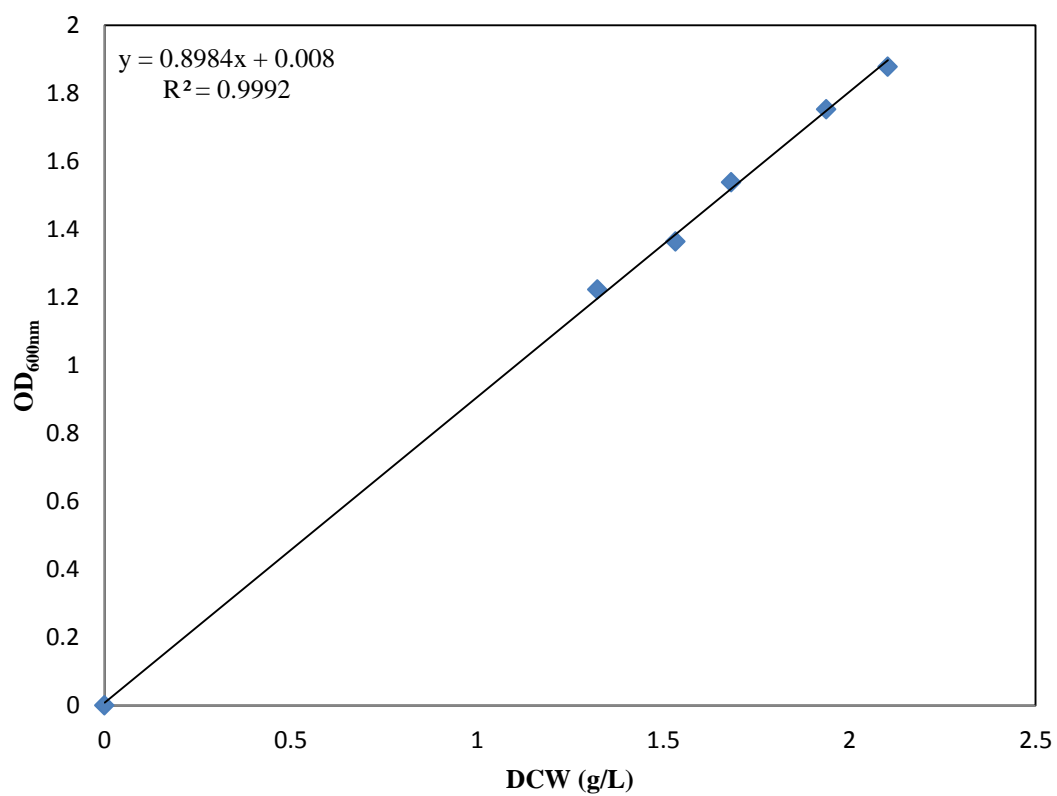
Wei-Chen Kao., De-Shun Lin., Chieh-Lun Cheng., Bor-Yann Chen., Chiu-Yue Lin., Jo-Shu Chang. (2013) .Enhancing butanol production with *Clostridium pasteurianum* CH₄ using sequential glucose–glycerol addition and simultaneous dual-substrate cultivation strategies. *Bioresource Technology*. 135:324-330.

Yung-Chung Lo., Wen-Ming Chen., Chun-Hsiung Hung., Shing-Der Chen., Jo-Shu Chang. (2008). Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: Feasibility and kinetic studies. *Water Research*. 42:827-842.

附錄

附錄 A

菌體乾重(Biomass)檢量線

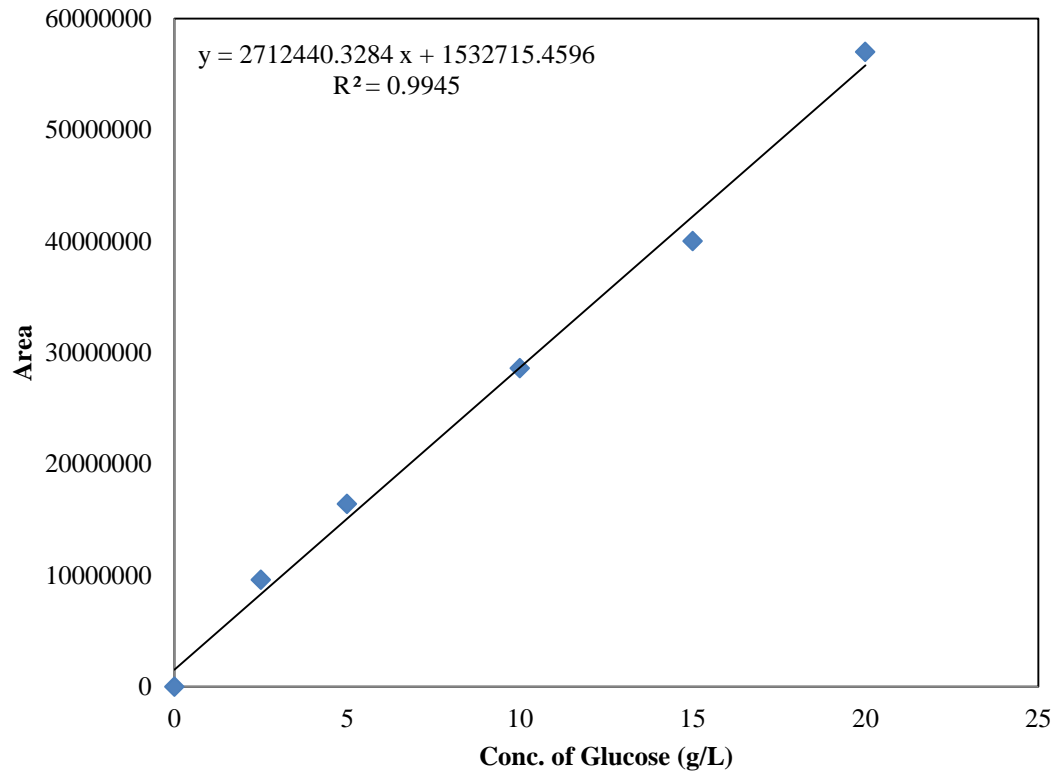


菌體乾重檢量線方程式：

$$\text{DCW(g/L)} = (\text{OD}_{600\text{nm}} - 0.008) / 0.8984$$

附錄 B

葡萄糖(Glucose)濃度檢量線

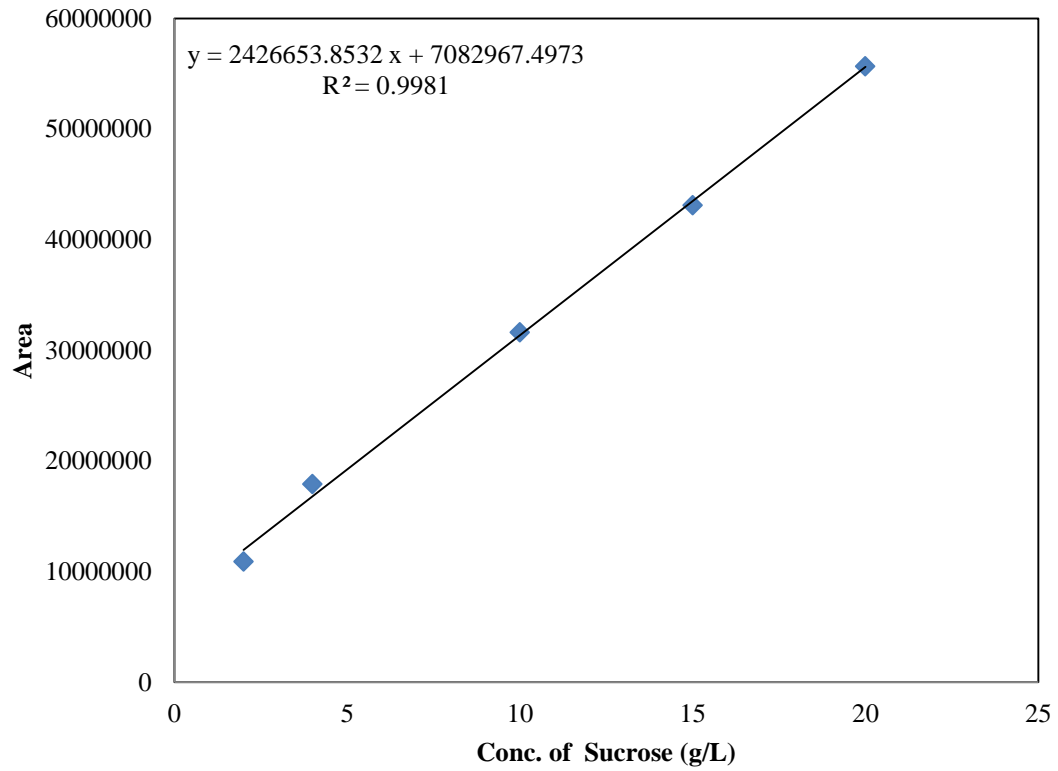


葡萄糖濃度檢量線方程式：

$$\text{Conc. of Glucose (g/L)} = (\text{Area} - 1532715.4596) / 2712440.3284$$

附錄 C

蔗糖(Sucrose)濃度檢量線

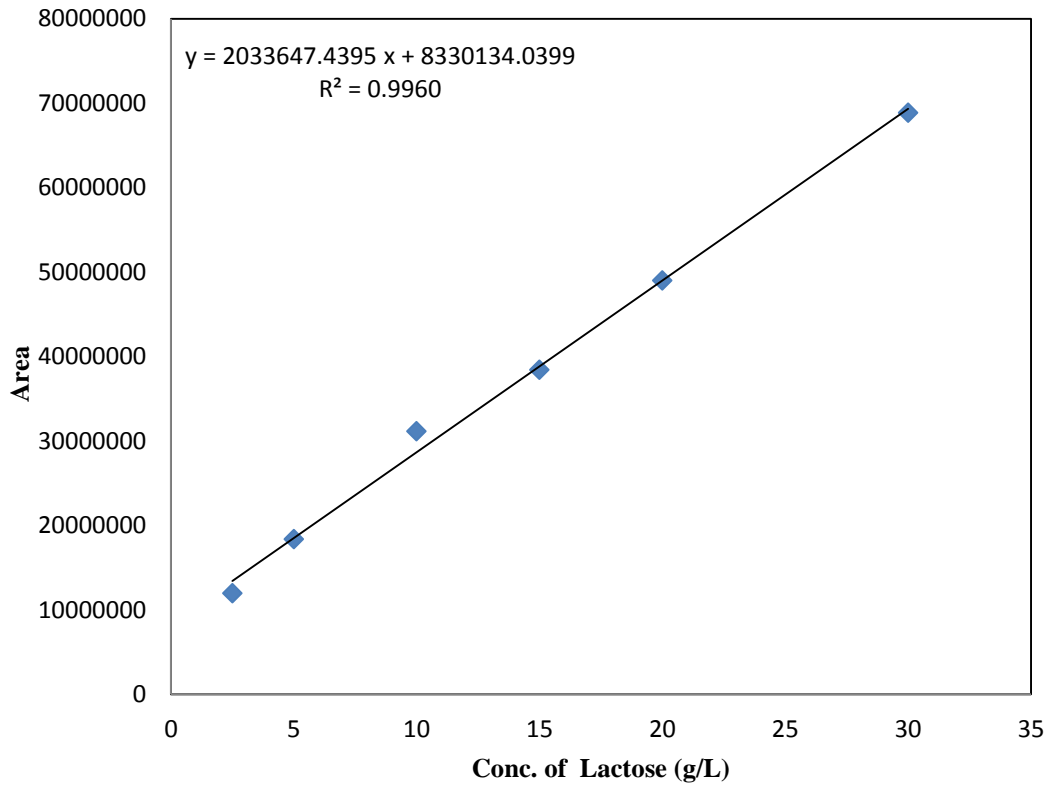


蔗糖濃度檢量線方程式：

$$\text{Conc. of Sucrose (g/L)} = (\text{Area} - 7082967.4973) / 2426653.8532$$

附錄 D

乳糖(Lactose)濃度檢量線

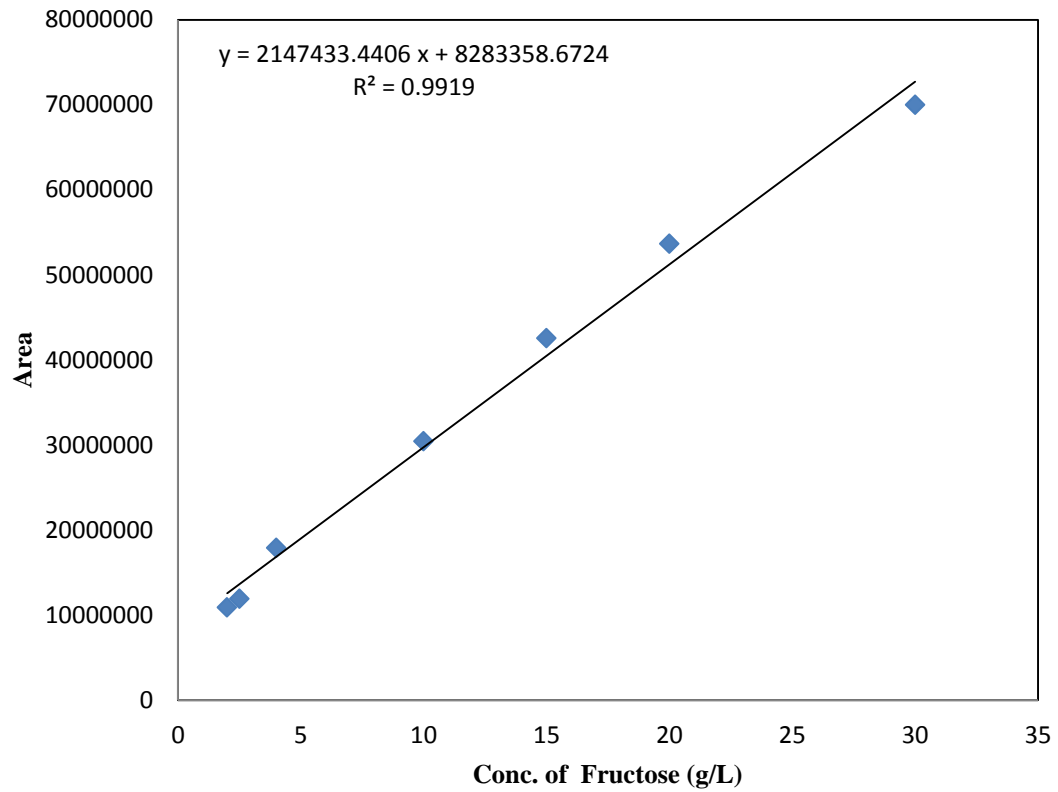


乳糖濃度檢量線方程式：

$$\text{Conc. of Lactose (g/L)} = (\text{Area} - 8330134.0399) / 2033647.4395$$

附錄 E

果糖(Fructose)濃度檢量線

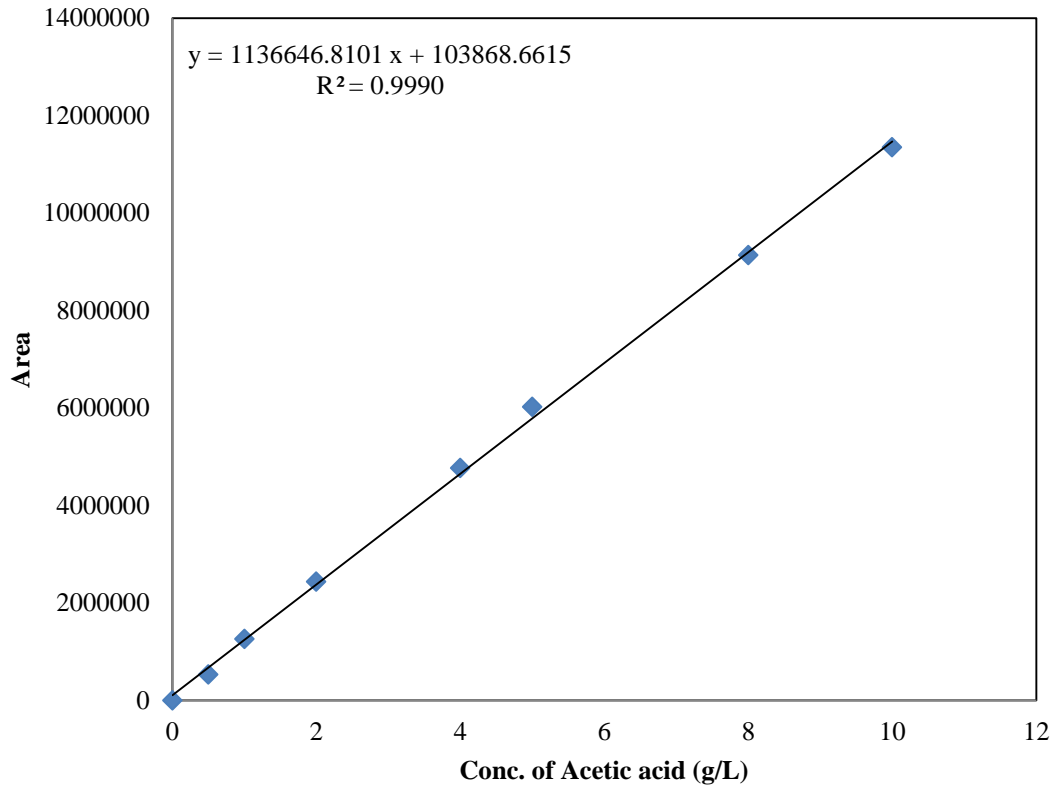


果糖濃度檢量線方程式：

$$\text{Conc. of Fructose (g/L)} = (\text{Area} - 8283358.6724) / 2147433.4406$$

附錄 F

乙酸(Acetic acid)濃度檢量線

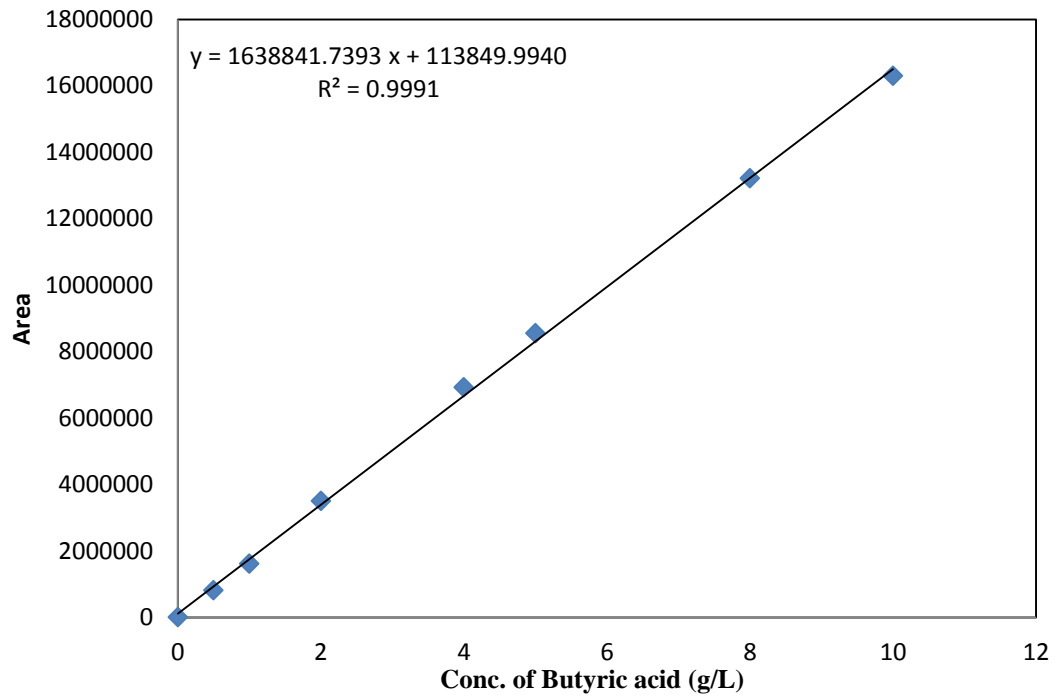


乙酸濃度檢量線方程式：

$$\text{Conc. of Acetic acid (g/L)} = (\text{Area} - 103868.6615) / 1136646.8101$$

附錄 G

丁酸(Butyric acid)濃度檢量線

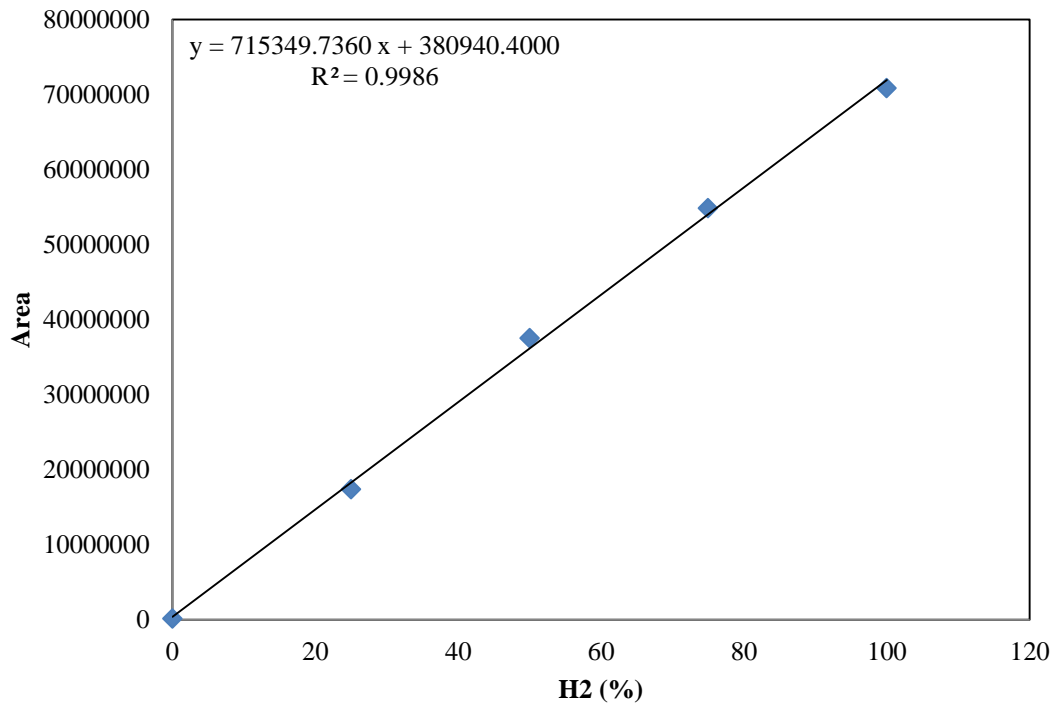


丁酸濃度檢量線方程式：

$$\text{Conc. of Butyric acid (g/L)} = (\text{Area} - 113849.994) / 1638841.7393$$

附錄 H

氫氣(Hydrogen)濃度檢量線

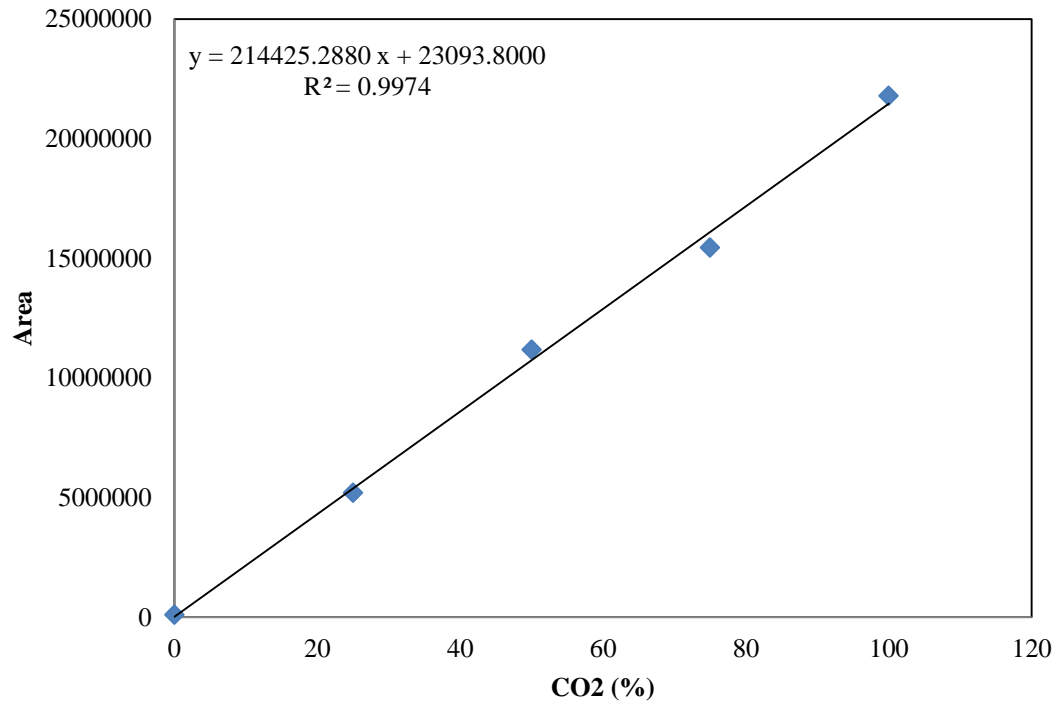


氫氣濃度檢量線方程式：

$$H_2 (\%) = (\text{Area} - 380940.4) / 715349.736$$

附錄 I

二氧化碳(Carbon dioxide)濃度檢量線



二氧化碳濃度檢量線方程式：

$$\text{CO}_2 (\%) = (\text{Area} - 23093.8) / 214425.288$$