

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏宏偉 博士

Advisor : Hong-Wei Yen, Ph.D.

應用吸附法和滲透蒸發分離方法探討 *Clostridium*

*acetobutylicum* 生產丁醇之影響

The application of adsorption and pervaporation for butanol  
production in the cultivation of *Clostridium acetobutylicum*

研究生：林尚甫 撰

Graduate student : Shang-Fu Lin

中華民國 100 年 6 月

June, 2011

## 摘要

使用厭氧菌 *Clostridium acetobutylicum* 進行 ABE(Acetone-Butanol-Ethanol) 發酵製程是一個歷史悠久的生物發酵製程，但是近年來生物發酵丁醇的製程已逐漸沒落，主要原因在於丁醇的抑制現象造成其生產效率低和碳源的低利用率，進而降低了生物發酵丁醇的商業生產競爭性。本研究中為了解決這個問題是採用了吸附法和滲透蒸發這兩項分離技術，藉由串聯發酵槽與同步分離系統進行高密度菌體發酵，且分別利用吸附法和滲透蒸發的移除效果同時降低發酵槽內丁醇的濃度，以有效的降低丁醇抑制情形，進而提高丁醇生產速率。

在吸附法中，使用活性碳當作吸附劑，其丁醇吸附能力為 42 mg/g，且能藉由油浴的方式將丁醇從活性碳中脫附出來。但是應用於 *C. acetobutylicum* 生產丁醇中並無顯著提升其丁醇生產速率(productivity)以及產率(yield)，反而降低其丁醇生產速率，推論可能是由於活性碳在吸附丁醇的同時也吸附發酵液中丁醇以外之物質，如營養物、酵素等等，如此會降低丁醇吸附量，並同時因為活性碳上吸附了營養物、酵素等菌體生長時必須物無因而降低了 *C. acetobutylicum* 的代謝速率，而無法有效提升丁醇生產速率。

在滲透蒸發系統中，選用對丁醇有不錯的選擇比的 PEBA (polyether-block-amide) 薄膜當作膜材，應用於 *C. acetobutylicum* 生產丁醇中，在  $7 \pm 1$  g / L 的丁醇發酵濃度進行滲透蒸發，其丁醇生產速率(butanol productivity)及產率(yield)是 0.277 g / l / h 和 0.207 g / g，相較於傳統批式發酵的 0.194 g / l / h 和 0.155 g / g 相對提升了 43 % 及 34 %。在總發酵時間 84 小時的葡萄糖饋料實驗中，以葡萄糖饋料濃度 50 (w/v) %、饋料流速為 15 ml / hr 進行饋料，其生產能力和產量是 0.270 g / l / h 和 0.169 g / g。在本研究中，藉由滲透蒸發分離技術將溶劑移除，我們能夠保持在 ABE 發酵液中的丁醇濃度維持在低於毒害菌體的範圍內。

**關鍵字:** ABE 發酵、*Clostridium acetobutylicum*、丁醇、吸附、滲透蒸發。

## Abstract

The ABE (acetone, butanol, ethanol) fermentation is characterized by its low productivity. In this paper, this issue is overcome with an innovative separation process that employs the adsorption and pervaporation technology. A control ABE fermentation experiment was characterized by incomplete glucose utilization due to butanol toxicity to *Clostridium acetobutylicum*, while fermentation coupled with in situ recovery by pervaporation and adsorption resulted in complete utilization of glucose, greater productivity, improved cell growth, and concentrated recovered ABE stream.

In adsorption process, use of activated carbon appears to be the more attractive as it can be used to concentrate butanol from model solutions and results in complete desorption of butanol. The butanol adsorption capacity of activated charcoal is 42 mg/g in model solution. Direct use of adsorbents without removing cells from the fermentation broth may foul the adsorbents. In order to overcome this problem, either a microfiltration or an ultrafiltration membrane can be placed between the adsorption column and bioreactor or cells can be centrifuged and returned to the reactor. Problems such as interactions between adsorbents and nutrients, sugars, biomass, toxicity of adsorbents, and the ease of desorption still remain to be addressed.

Acetone butanol ethanol (ABE) were produced in an integrated fermentation-product recovery system using *Clostridium acetobutylicum*, a PEBA (polyether-block-amide) membrane and a 5-L fermentor containing initial substrate (glucose) concentration of 80 g/L. Cells of *C. acetobutylicum* were removed from the cell culture using a ceramic filtration and returned to the 5-L fermentor. The ABE was removed from the filtration permeate using a PEBA pervaporation membrane.

A PEBA pervaporation membrane was synthesized to recover acetone, butanol, and ethanol from model solutions and the *Clostridium acetobutylicum* (ABE) fermentation broth. At the effects of beginning concentration of butanol to the performance of ABE fermentation incorporating with pervaporation. At  $7\pm 1$  g/L butanol concentration to operate pervaporation have the higher butanol productivity and yield is 0.277 g /l/ h and 0.207 g/g. A continuous operation with pervaporation and feeding 150 g/L glucose at the rate of 15 ml/hr for 24 h. It have the butanol productivity and yield is 0.270 g /l/ h and 0.169 g/g for 84 hours.

In situ removal of ABE by pervaporation has been reported to be one of the most important techniques of solvent removal. During these studies we were able to maintain the ABE concentration in the fermentation broth below toxic levels.

**Keywords:** ABE fermentation, *Clostridium acetobutylicum*, butanol, adsorption , pervaporation.

## 誌謝

感謝恩師 顏宏偉教授、楊怡寬教授與楊芳鏘教授在這兩年來的諄諄教誨與殷切教導，特別對於研究態度、求學方法與待人處事之道，使得我在研究所期間受益良多，同時也感謝劉永銓教授與張耀南教授對於本論文的批評與指教，使得本論文能順利完成，在此由衷地表達謝意與敬意。

研究所期間感謝嘉麟學長、宜珈學姐與于萱學姐在生活上與實驗上苦口婆心的指導與糾正，感謝同學 瑞真、證雄、智勇、浩緯、靖涵、翌晨、方偉、雅婷、佳蓉和慧雅，在求學期間給予幫助與生活上互相的調侃，也感謝學弟妹 偉誠、志恆、欣培、羽軒、嘉豪、鈺婷、儷娟、淋傑，在實驗上的協助與支援，亦感謝東海大學所有的人、事、物，讓我能在求學期間擁有許多令人難以忘懷的美好回憶。最後僅以此篇論文獻給我的家人以及郁雅，感謝你們的栽培與支持，讓我無後顧之憂地完成我的學業。

林尚甫 謹識于

東海大學化學工程與材料工程研究所

2011年7月

## 目錄

摘要.....	I
Abstract.....	II
誌謝.....	IV
目錄.....	V
表目錄.....	IX
圖目錄.....	XI
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
<b>2-1 生質能源介紹</b> .....	<b>2</b>
<b>2-2 丁醇簡介</b> .....	<b>3</b>
<b>2-3 丁醇生產方法</b> .....	<b>5</b>
2-3-1 微生物發酵程序產丁醇(butanol).....	5
2-3-2 化學合成法.....	8
<b>2-4 生產丁醇之菌種</b> .....	<b>9</b>
<b>2-5 不同分離技術對丁醇回收之能源耗費</b> .....	<b>10</b>
<b>2-6 吸附簡介</b> .....	<b>12</b>
2-6-1 吸附機構.....	12
2-6-2 吸附原理.....	12
<b>2-7 滲透蒸發簡介</b> .....	<b>14</b>
2-7-1 滲透蒸發原理.....	14
2-7-2 發展歷史.....	15
2-7-3 滲透蒸發薄膜.....	16
2-7-4 滲透蒸發膜應用於丁醇發酵.....	18

<b>2-8 增加丁醇產量的發酵策略</b> .....	<b>19</b>
<b>第三章 實驗材料與方法</b> .....	<b>22</b>
<b>3-1 實驗材料</b> .....	<b>22</b>
3-1-1 實驗菌株.....	22
3-1-2 實驗藥品.....	22
<b>3-2 實驗儀器</b> .....	<b>24</b>
<b>3-3 分析方法</b> .....	<b>25</b>
3-3-1 Biomass 分析法.....	25
3-3-2 Glucose 分析方法.....	25
3-3-3 GC 分析方法.....	25
<b>3-4 實驗方法</b> .....	<b>26</b>
3-4-1 菌種保存.....	26
3-4-2 種子培養基配製(Seed medium, SM).....	26
3-4-3 發酵培養基配製(Fermentation medium, FM).....	27
3-4-4 接菌.....	28
<b>3-5 實驗架構</b> .....	<b>29</b>
<b>3-6 實驗步驟</b> .....	<b>30</b>
3-6-1 5-L 攪拌式發酵槽之批次發酵.....	30
3-6-3 吸附劑之選擇.....	30
3-6-4 脫附率之探討.....	30
3-6-5 不同時間添加活性碳於發酵搖瓶探討.....	31
3-6-6 發酵液經由微過濾去除菌體後進行活性碳吸附程序.....	31
3-6-7 發酵液直接進行活性碳吸附程序.....	32
3-6-8 PDMS 薄膜製作.....	32
3-6-9 PEBA 薄膜製作.....	32
3-6-10 滲透蒸發膜材之選擇.....	34

3-6-11 滲透蒸發系統(PV)之操作溫度選擇 .....	34
3-6-12 滲透蒸發系統之質量平衡 .....	35
3-6-13 不同丁醇濃度進行滲透蒸發之探討 .....	35
3-6-14 結合滲透蒸發與連續饋料對生產丁醇之探討 .....	36
第四章 結果與討論 .....	37
<b>4-1 5-L 攪拌式發酵槽之批次發酵程序 .....</b>	<b>37</b>
<b>4-2 吸附實驗 .....</b>	<b>38</b>
4-2-1 吸附物選擇 .....	38
4-2-2 脫附實驗 .....	39
4-2-3 添加活性碳於發酵液之時間點探討 .....	40
4-2-4 發酵液經由微過濾去除菌體後進行活性碳吸附程序 .....	41
4-2-5 發酵液直接進行活性碳吸附程序 .....	42
4-2-6 總結 .....	44
<b>4-3 滲透蒸發實驗 .....</b>	<b>45</b>
4-3-1 滲透蒸發膜材選擇 .....	45
4-3-2 滲透蒸發溫度探討 .....	48
4-3-3 滲透蒸發系統之質量平衡探討 .....	50
4-3-4 不同丁醇濃度發酵程序進行滲透蒸發系統移除 .....	51
4-3-5 結合滲透蒸發與葡萄糖饋料應用於 ABE 發酵 .....	56
4-3-6 總結 .....	60
第五章 結論與建議 .....	61
<b>5-1 結論 .....</b>	<b>61</b>
<b>5-2 未來展望 .....</b>	<b>62</b>
參考文獻 .....	63
附錄 .....	68
<b>附錄 1: 菌體乾重 (biomass) 檢量線 .....</b>	<b>68</b>
<b>附錄 2: 丙酮 (acetone) 檢量線 .....</b>	<b>69</b>

附錄 3:乙醇 (ethanol) 檢量線 .....	69
附錄 4:丁醇 (butanol) 檢量線 .....	70
附錄 6:丁酸 (butyric acid) 檢量線.....	71
附錄 7: 滲透蒸發操作前之 PEBA 薄膜之 SEM 圖 .....	72
附錄 8: 滲透蒸發薄膜操作 24 小時後之 PEBA 薄膜之 SEM 圖 .....	72
簡歷.....	73

## 表目錄

表 2-1 丁醇之應用 .....	4
表 2-2 乙醇 (ethanol) 與丁醇 (butanol) 之特性 .....	4
表 2-3 不同吸附劑對丁醇之吸附能力(N. Qureshi et al.,2005) .....	13
表 2-4 比較不同滲透蒸發薄膜之 Butanol flux 和 Separation factor.....	21
表 3-1 實驗藥品 .....	22
表 3-2 實驗儀器 .....	24
表 3-3 RCM 培養基 .....	26
表 3-4 發酵培養基 .....	27
表 3-5 Mineral salt solution 組成 .....	28
表 4-1 A-B-E 在顆粒狀活性碳之脫附能力 .....	39
表 4-2 應用活性吸附碳裝置於 ABE 發酵之 Butanol produced、butanol productivity & Yield 及 Glucose utilization 比較 .....	43
表 4-3 文獻上利用吸附法應用在 ABE 發酵對 solvents productivity & yield 比較.....	44
表 4-4 不同滲透蒸發薄膜對 solvents 和 acids flux 和 removal volume 比 較.....	47
表 4-5 不同滲透蒸發薄膜對 solvents 和 acids 之 Separation factor 比較	

.....	47
表 4- 6 A-B-E 在滲透蒸發系統之質量平衡.....	50
表 4- 7 不同丁醇發酵濃度進行滲透蒸發與傳統批次發酵對於 Butanol produced、Butanol productivity&Yield 及 Glucose utilization 比較	54
表 4- 8 不同丁醇發酵濃度進行滲透蒸發之 solvents 和 acids flux 比較 .....	57
表 4- 9 不同丁醇發酵濃度進行滲透蒸發之 solvents 和 acids Separation factor 比較 .....	57
表 4- 10 葡萄糖饋料進行滲透蒸發與傳統批次發酵對於 Butanol produced、Butanol productivity&Yield 及 Glucose utilization 比較	58
表 4- 11 文獻上利用滲透蒸發應用在 ABE 發酵對 solvents productivity & yield 比較.....	58

## 圖目錄

圖 2- 1 Fermentation pathways in <i>C. acetobutylicum</i> .....	7
圖 2- 2 化學合成丁醇反應式 .....	8
圖 2- 3 不同分離技術對丁醇回收之能源需求比較 .....	11
圖 2- 4 滲透蒸發示意圖 .....	14
圖 2- 5 PDMS(polydimethylsiloxane)之化學結構式 .....	17
圖 2- 6 PEBA(polyether-block-amide)之化學結構式 .....	18
圖 3- 1 實驗架構 .....	1
圖 3- 2 以 PDMS 製作出來之滲透蒸發薄膜放置在玻璃片上 .....	33
圖 3- 3 利用 PEBA 製作出來之滲透蒸發薄膜 .....	33
圖 3- 4 滲透蒸發系統串聯發酵槽流程圖 .....	34
圖 4- 1 菌體、葡萄糖及 ABE 濃度在 5 L 發酵槽之批次發酵的發酵情形 .....	37
圖 4- 2 PE、PC、PLA 和 AC 之吸附丁醇能力比較.....	38
圖 4- 3 Total A-B-E 生產在不同時間添加顆粒狀活性碳於搖瓶批次發酵 之發酵情形.....	40
圖 4- 4 添加活性碳於發酵液之時間點探討:左邊為 0 小時添加活性碳、	

右邊為 12 小時添加活性碳.....	41
圖 4-5 菌體、葡萄糖及 ABE 濃度在 5 L 發酵槽中，在發酵 24hr 後發 液經由微過濾去除菌體菌體後進行 1 小時活性碳吸附程序的發 情形.....	42
圖 4-6 菌體、葡萄糖及 ABE 濃度在 5 L 發酵槽中，在發酵 24hr 後發 液直接進行 1 小時活性碳吸附程序的發酵情形.....	43
圖 4-7 比較 PEBA 和 PDMS 薄膜對移除模擬溶液中丁醇濃度之下降趨 勢圖.....	46
圖 4-8 利用 PEBA 薄膜進行滲透蒸發之槽內 A-B-E 濃度變化以及收集 端之 A-B-E 濃度變化趨勢圖.....	46
圖 4-9 不同滲透蒸發操作溫度(37、50、60 °C)對滲透蒸發端產物移除 通量變化情形.....	49
圖 4-10 不同滲透蒸發操作溫度(37、50、60 °C)對滲透蒸發端產物選擇 比變化情形.....	49
圖 4-11 不同丁醇發酵濃度進行滲透蒸發與批次發酵對於 Biomass 生長 情形比較.....	52
圖 4-12 發酵槽在丁醇濃度= 4±1 g/L 時，串聯滲透蒸發系統進行批次發 酵生產 ABE 之情形.....	52
圖 4-13 5 L 發酵槽在丁醇濃度= 7±1 g/L 時，串聯滲透蒸發系統進行批	

次發酵生產 ABE 之情形.....	53
圖 4- 14 5 L 發酵槽在丁醇濃度= 10±1 g/L 時，串聯滲透蒸發系統進行批	
次發酵生產 ABE 之情形.....	53
圖 4- 15 發酵過濾液及滲透蒸發回收液展示圖 .....	55
圖 4- 16 應用陶瓷過濾模組以及滲透蒸發系統於 5-L 發酵槽之操作情形	
.....	55
圖 4- 17 5-L 發酵槽串聯滲透蒸發與葡萄糖饋料生產 ABE 之情形	
.....	57

## 第一章 緒論

由於近年來的石油價格快速攀升，以及大量石化產品所導致的環境問題，包括溫室效應等等，在加上京都議定書的正式生效所衍生的碳排放問題，以可再生能源取代石化能源已成為近年來熱門議題。其中以微生物發酵生成丁醇(butanol)的研發更被美國能源部(DOE)視為未來研發替代能源的中程目標之一。其著眼點就在於丁醇擁有比乙醇較佳的疏水性，可有效的避免空氣中水氣的累積於油箱的問題，同時丁醇的腐蝕性相對的也比乙醇低，因此可利用現有的管線傳送到加油站；使用高比率的丁醇添加的混合汽油燃料時，車輛的引擎系統規格不必更動；而且丁醇相較於乙醇可多產生25 %能量。丁醇發酵又稱為ABE發酵，主要原因就在於丁醇(butanol)生成時會連帶產生丙酮(acetone)及乙醇(ethanol)。使用厭氧菌 *Clostridium acetobutylicum* 進行ABE 發酵製程是一個熟為人知的生物發酵製程。但是丁醇發酵製程的困難主要是在於高單價基質所帶來的低經濟競爭性，以及丁醇本身毒性影響所造成的低濃度丁醇發酵，進而導致後段分離純化丁醇的高耗能結果。

由於丁醇本身的低極性對細胞膜所造成毒性將會降低丁醇的發酵濃度，因此本研究在結合滲透蒸發薄膜(pervaporation)的應用，串連發酵槽進行高密度菌體發酵，且利用滲透蒸發薄膜的移除效果同時降低發酵槽內丁醇的濃度，以有效的降低丁醇抑制情形，進而提高丁醇生產速率。

## 第二章 文獻回顧

### 2-1 生質能源介紹

生質能源主要指氣態、液態或固態的生質燃料；氣態者有生質氫氣與沼氣(甲烷)等，液態者有生質酒精(乙醇)、丁醇、柴油與裂解油等，固態者有廢棄物衍生性燃料(RDF)等。隨著石油價格持續攀升，未來幾年生質能源的產能將持續擴張。2007 年全球生質燃料產值達 277 億美金，在 2015 年產值可望達 533 億美元 (<http://www.epochtimes.com/b5/7/11/25/n1913178.htm>)。

早期的生質能源是指將都市垃圾、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，這種能源就是生質能源。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生質資源。此外，生質能源還具有多項優點，如提供低硫燃料，可降低空氣汙染；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汙染傷害低(周, 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 丁醇簡介

丁醇 (*n*-butanol)，學名為 *n*-butyl alcohol，分子式為  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ，分子量為 74.12 g/mol，為透明無色液體，具臭味，可溶於醇、醚及其他有機溶劑之中，且微溶於水，是重要的精細化工原料。

丁醇為重要的有機化學原料，主要用途為做植物油、生物鹼、有機染料和印刷油墨之溶劑，它可以溶解油類、樹脂、蠟質等，也用於生產鄰苯二甲酸二丁酯 (DBP)、鄰苯二甲酸苯基丁酯 (BBP) 等增塑劑及醋酸丁酯、丙烯酸丁酯等化學品；除了在塗料、製藥、化妝品、有機合成和塑膠工業等方面有著廣泛的應用外，現今更被視為熱門的生質燃料 (表 2-1)。

做為生質燃料方面，由於丁醇與汽油的混合比高，故無需對車輛進行改造，就可使用濃度幾乎 100% 的丁醇；且與同屬醇類燃料的乙醇 (ethanol) 相比，其優越的性質，如能源含量高、揮發性低、對水的溶解度與吸收度低，可直接使用現有燃料供應管道運輸等，使丁醇被歸為優於乙醇的替代能源 (表 2-2) (Durre, 2007)。

表 2-1 丁醇之應用

Applications	Used/Methods
solvents	for paints, varnishes, resins, gums dyes, camphor, fats, waxes, rubbers and alkaloids
plasticizers	to improve how a plastic material processes
coatings	as a solvent for a variety of applications, such as curable lacquers and cross-linked baking finishes
chemosynthesis	for producing many other chemicals and plastics, including safety glass, hydraulic fluids and detergent formulations
textiles	as a swelling agent and manufacturing garments from coated fabric
cosmetics	for eye makeup, foundations, lipsticks, nail care products, personal hygiene products and shaving product
medicines	drugs and antibiotics, hormones, and vitamins
fuels	gasoline ( as an additive ) and brake fluid ( formulation component )
others	flotation agents, cleaners, and floor polishes

資料來源：<http://www.dow.com/productsafety/finder/nbut.htm>

表 2-2 乙醇 (ethanol) 與丁醇 (butanol) 之特性

properties	ethanol	butanol
Energy content ( Btu/gal )	84,000	105,000
Energy density ( MJ/L )	19.6	29.2
Boiling point ( °C )	78	117.7
Solubility ( ml/100 ml H <sub>2</sub> O )	<i>infinite</i>	9.1
Air-fuel ratio	9.0	11.2
Additive ratio ( % )	85	100

Mileage (mpg)	17.6	25
Corrosive	higher	lower
Shipment	rail, barge or truck	fuel pipelines

### 2-3 丁醇生產方法

生產丁醇的方式有微生物發酵法與化學合成法。利用微生物發酵法生產丁醇於 1861 年由 Pasteur 發表後，各地的學者們開始研究與探討。如 Weizmann 於研究合成橡膠的過程中，發現丁醇或異戊醇是重要的化學合成中間物，並於 1914 年，提出利用 *Clostridium acetobutylicum* 菌株來進行 ABE (acetone-butanol-ethanol) 發酵法。1960 年代，由於石化合成技術的迅速發展，且發酵法生產所需的原料成本高、程序複雜和產物不易回收等因素，導致微生物發酵法逐漸被較具經濟效應的化學合成法取代，微生物發酵法生產丁醇的研究漸漸不受重視而停滯，僅剩南非、蘇聯等國因受到國際禁運而缺乏石油，仍持續維持進行發酵製程。1973 年能源危機發生，隨著石油資源日益緊缺造成原油價格竄升，各地開始紛紛投入利用可再生資源來取代石油原料的研究，以微生物發酵丁醇 (ABE) 之研究再次興起 (Jones and Woods, 1986)。

現今已有杜邦 (DuPont) 和英國石油公司 (British Petroleum, BP) 一起聯手合作開發，結合杜邦的生化科技和製造能力，以及 BP 的燃料科技和市場運作專長，藉以推廣生質丁醇 (biobutanol)。此研究不僅能改善石油危機帶來之衝擊，也為人們製造更具環保的能源。

#### 2-3-1 微生物發酵程序產丁醇(butanol)

採用微生物發酵方式生產丁醇，早在 1861 年就由 Pasteur 所發表，同時也被世界各地的學者們持續研究、探討。因丁醇具有相當廣泛之用途，可做為化學合成中間物、溶劑、萃取劑和增塑劑等，更有其他企業將之工業化生產。1930 年代 Weizmann 於 Manchester 大學發展出了可量化生產丁醇的發酵製程 Weizmann

後來成為以色列的第一任總統)(Woods.,1986)。但在石油化工合成技術迅速發展的1960年代，由於發酵生產所需原料成本高、程序複雜且產物回收不便，因此丁醇發酵程序則逐漸被較具經濟效應的化學合成法取代，造成以生物方式生產丁醇之研究停滯，僅剩南非、蘇聯等國因受到國際禁運而缺乏石油，所以仍持續進行發酵製程。而在1973年能源危機發生，隨著石油資源日益緊缺造成原油價格竄升，使得世界各地紛紛投入利用可再生資源來取代石油原料之研究，進一步促使以各種微生物發酵研究重新顯示出其優勢並再次興起。

一般而言，透過微生物發酵程序來生產丁醇的發酵製程又稱為 ABE 發酵，主要原因就在於其代謝產物包含丙酮(Acetone), 丁醇(Butanol) 以及乙醇(Ethanol)。若以厭氧菌*Clostridium* 作為生產菌種時，其標準的ABE 產量比例約為3:6:1。丁醇反應代謝路徑如圖2-1所示，主要依其生成之產物不同而分為兩階段。首先，於發酵前期*Clostridium acetobutylicum* 利用glucose 經由glycolysis 路徑產生pyruvate，並進一步生成大量的有機酸 (acidogenic phase) 包括acetate, butyrate, lactate 等，這產酸過程同時會釋放出CO<sub>2</sub> 和H<sub>2</sub>，由於大量的酸性物生成進而導致此階段的發酵液pH 值有迅速下降之趨勢。

在第二階段溶劑生產期(solventogenesis)的開始涉及碳代謝由產酸途徑向產溶劑途徑的轉變，這種轉變機制目前尚未研究透徹。早期的研究認為，這種轉變和pH 值的降低以及酸的積累是密不可分的。在產酸期產生大量的有機酸，不利於細胞生長，所以產溶劑期的酸利用被認為是一種減毒作用。但是pH 值的降低以及酸的積累並不是產酸期轉向溶劑生產期的必要條件。當有機酸酸的含量超過一定值，尤其是在butyric acid的濃度大於2 g/L且pH值下降至低於5時，便開始正式進入發酵後期的溶劑生產期 (solventogenic stage)，此時期的主要代謝路徑是先藉由acetoacetyl-CoA轉變成acetone之反應途徑，促使前發酵產物 acetic acid 、butyric acid還原成acetyl-CoA及butyryl-CoA，再進一步利用butyraldehyde dehydrogenase (BYDH)和丁醇 dehydrogenase (BDH)之催化，讓中間產物

butyryl-CoA還原成主產物—丁醇。(Ezeji.,2007)

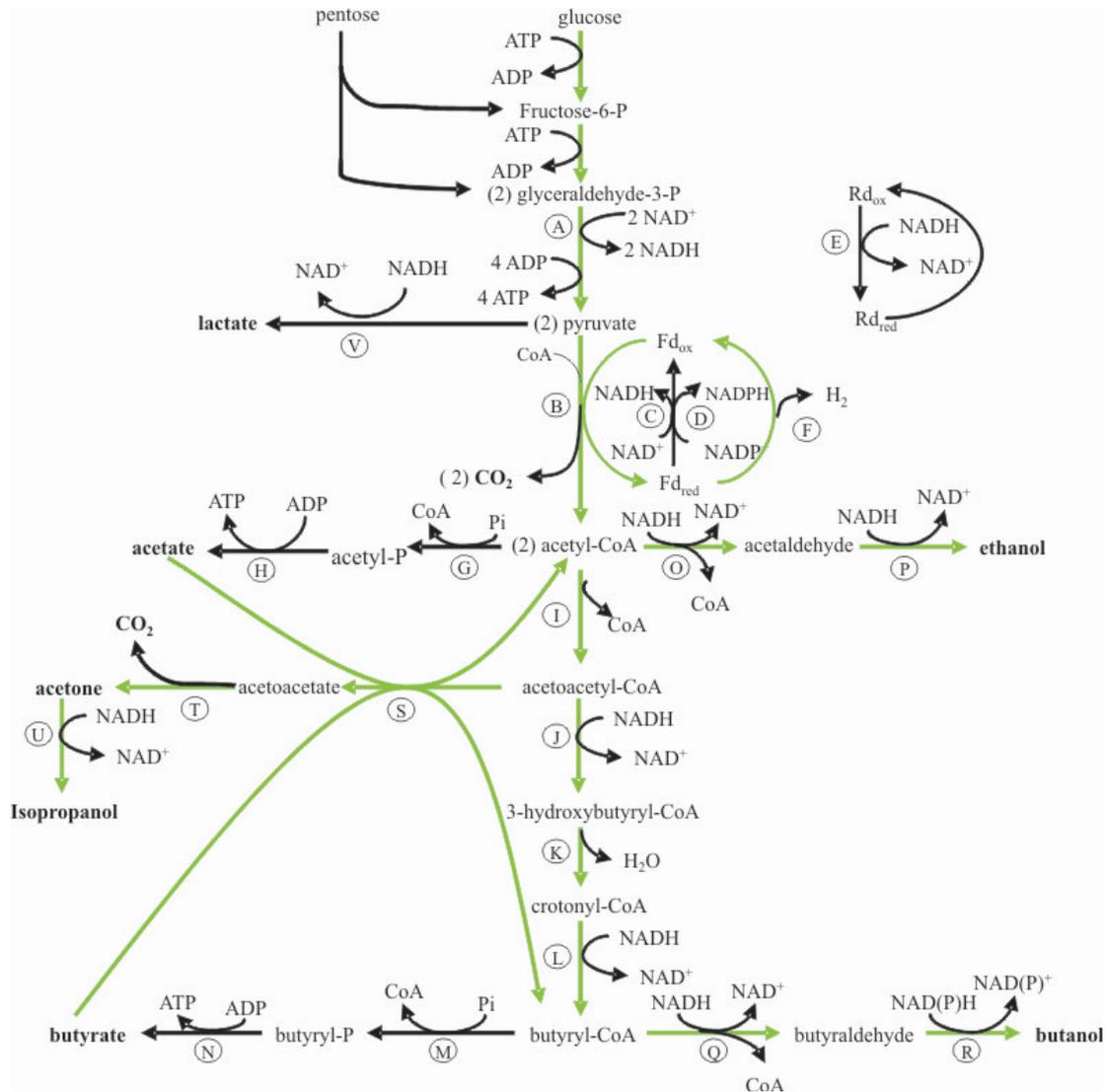


圖 2- 1 Fermentation pathways in *C. acetobutylicum*. (Ezeji.,2007)

Enzymes are indicated by letters as follows:

(A)glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; (B) pyruvate-ferredoxin oxidoreductase; (C)NADH-ferredoxin oxidoreductase; (D) NADPH-ferredoxin oxidoreductase; (E) NADH rubredoxinoxidoreductase; (F) hydrogenase; (G) phosphate acetyltransferase (phosphotransacetylase); (H) acetatekinase; (I) thiolase (acetyl-CoA acetyltransferase); (J) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; (K)crotonase; (L) butyryl-CoA dehydrogenase; (M) phosphate butyltransferase (phosphotransbutyrylase);(N) butyrate kinase; (O) acetaldehyde dehydrogenase; (P) ethanol dehydrogenase; (Q) butyraldehydedehydrogenase; (R) Butanol dehydrogenase; (S) acetoacetyl-CoA:acetate/butyrate:CoA transferase; (T)acetoacetate decarboxylase; (U) phosphoglucomutase; (V) ADP-glucose pyrophosphorylase; (W)granulose (glycogen) synthase; (X) granulose phosphorylase.



## 2-4 生產丁醇之菌種

丁醇發酵程序之菌種主要為*Clostridium*屬的嚴格厭氧菌。而依照其對碳源的喜好程度不同大致可分為兩大類，一種是發酵澱粉類，常見的如*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824和*Clostridium acetobutylicum* DSM 1731；另一種是發酵糖蜜，如*Clostridium beijerinckii*、*Clostridium acetobutylicum* NCIMB 8052和*Clostridium saccharoperbutylacetom* N1-4。其中，又以*Clostridium acetobutylicum*之發酵程序探討較為普遍。(Ezeji et al., 2008)。

*Clostridium acetobutylicum*為革蘭氏陽性菌(Gram-positive)，於1974年被Smith和Hobbs所提出，因此菌株可產生acetone和butyl alcohol而命名之。外觀上呈直桿狀且具移動性，細胞周圍有鞭毛，屬於典型的嚴格厭氧菌。一般存在於土壤、人和牛的排泄物、污水、湖裡的沉積物和蛤的內臟。適合生長的溫度為15~69°C，但在pH值為6.5-7.0及溫度30~37°C的環境中生長較快。由於能將多種碳氫化合物經發酵轉成acetone-丁醇-ethanol (ABE)和H<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>而獲得學者們巨大的興趣。

在進行發酵過程中，以溫度 37°C最為適當，此外biotin、p-aminobenzoic (PABA)這兩種必須營養素之含量亦會影響菌種生長情形。等到培養超過18小時，當菌體進入stationary phase 並且細胞伴隨著型態上的改變，此時丁醇和 acetone 的產量將達到最高。

表 2-3 *Clostridium* 生產 ABE 對碳源的利用情形 (Ezeji et al., 2008)

Organisms	Sugar preference*
-----------	-------------------

<i>C. acetobutylicum</i> 260	glucose > cellobiose > mannose > arabinose > galactose > xylose
<i>C. acetobutylicum</i> 824	glucose > arabinose > xylose > cellobiose > galactose > mannose
<i>C. saccharobutylicum</i> 262	glucose > arabinose > galactose > cellobiose > xylose > mannose
<i>C. butylicum</i> NRRL 592	glucose > cellobiose > mannose > arabinose > galactose > xylose
<i>C. beijerinckii</i> BA 101	cellobiose > glucose > xylose > arabinose > mannose > galactose

---

\*依最大 ABE 產量而定

## 2-5 不同分離技術對丁醇回收之能源耗費

選擇節能的分離技術應用在丁醇回收，對於未來在工業上應用具有相當大的競爭力。因此評估對不同分離技術對丁醇回收的能源需求，這些技術包括：蒸餾(steam stripping distillation)、氣提(gas stripping)、吸附(adsorption)、滲透蒸發(pervaporation)和液-液相萃取(liquid-liquid extraction)。其不同分離技術對丁醇回收能耗比較如圖 2-3。(Qureshi et al.,2005)

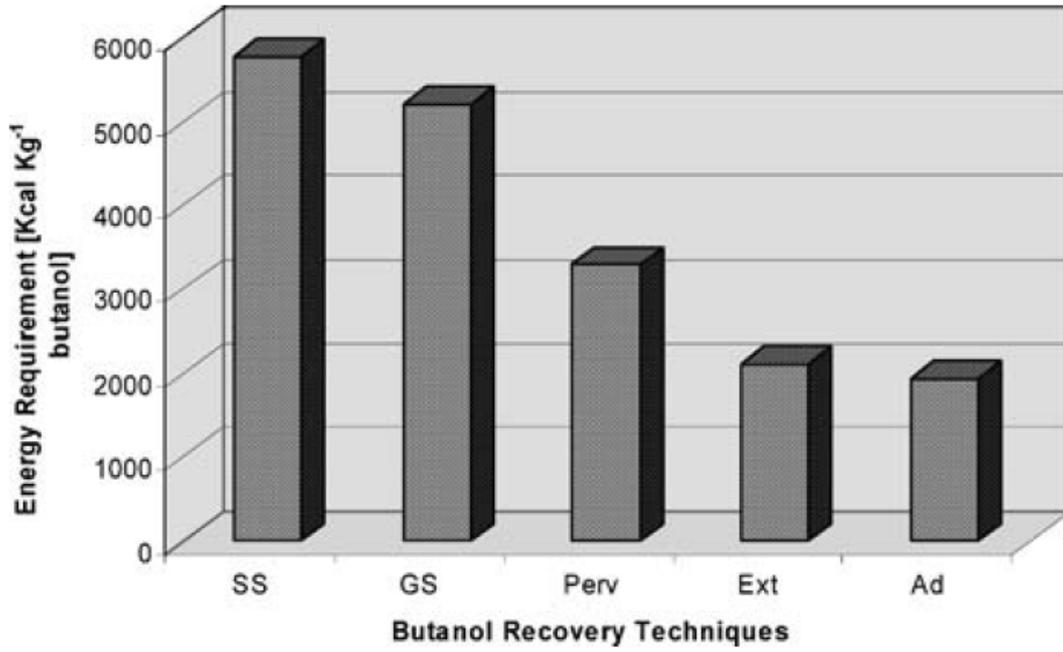


圖 2-3 不同分離技術對丁醇回收之能源需求比較

SS—steam stripping distillation; GS—gas stripping; Perv—pervaporation;  
Ext—liquid-liquid extraction; Ad—adsorption

## 2-6 吸附簡介

### 2-6-1 吸附機構

固體吸附劑的表面積可分為外表面積與內表面積，固體吸附劑的表面型態和孔洞結構是決定其吸附性能的主要結構參數，大孔主要的作用是將被吸附之物質由外表面向內部輸送，所以大孔也叫做進入孔，或叫做擴散孔。中孔主要是輸送被吸附之物質，而對較大之分子也具有吸附作用，而微孔與超微孔有較強的吸附作用，其中超微孔是吸附的主要結構。又吸附劑孔徑的大小與分佈對被吸附物質的分子大小、分子量有關。

### 2-6-2 吸附原理

將固體置入於特定液體溶液或是混合氣體當中，其固體重量逐漸增加，同時溶液或是混合氣體當中的特定成分逐漸降低時，此時可以宣稱液體或氣體中的該成分被固體吸附(adsorb)；該固體稱為吸附劑(adsorbent)，而其液體或是氣體中的某成分稱之為吸附質(adsorbate)。

吸附現象是來自於吸附質與吸附劑之間的分散力不同，造成彼此間電子的快速移動進而產生偶極矩(dipole moment)。吸附的機制會因吸附質與吸附劑間之作用力的不同而分為兩種：物理吸附以及化學吸附。

#### 1. 物理吸附(physical adsorption)

物理吸附的主要作用力：包括凡得瓦爾力，其中包含極化(polarization)、偶極(dipole)之間的相互作用，由以上作用力所產生的多層吸附可以稱為物理吸附，物理吸附與氣體在固體表面液化相似，二者藉由凡得瓦力結合，其能量變化相當液化過程的數值，由於吸附未牽涉化學鍵的破壞重組，故吸附量不像化學吸附一樣受限制於單層吸附，而有多層吸附的現象。

## 2.化學吸附(chemical absorption)

化學吸附是被吸附物質和吸附劑表面之間因親和力產生分子軌域重疊的現象，使被吸附物質和吸附劑之間產生化學鍵結，其性質與化學鍵類似，一般吸附鍵發生於固體的表面活性中心，且化學吸附遠比物理吸附作用的凡得瓦爾力強。(顧惕人, 1999)

表 2- 3 不同吸附劑對丁醇之吸附能力(Qureshi et al.,2005)

Adsorbent	Components present in feed	Butanol in feed solution (g/L)	Butanol adsorption capacity(mg /g)
Silicalite	BE*	21.5	97
Activated Charcoal(granular)	Butanol	5.0–30.0	130
Bone Charcoal	Butanol	5.0–30.0	206
Silicalite	ABEHaHb**	10	48
Activated Carbon	Butanol	15	252
Resins(XAD-4)	Butanol	14.4	100
Resins(XAD-2)	Butanol	16.5	78
Resins(XAD-8)	Butanol	15.5	66
Amberlite (XAD-7)	Butanol	20	69
Amberlite( XAD-4)	Butanol	20	83
Bonopore	Butanol	20	74
Bonopore – nitrated	Butanol	20	55
Polyvinylpyridine	Butanol	14.9	68

\*butanol ethanol mixture

\*\* acetone, butanol, ethano, acetic acid and butyric acid mixture

## 2-7 滲透蒸發簡介

### 2-7-1 滲透蒸發原理

滲透蒸發(pervaporation)是近幾年來常被學者研究的薄膜分離程序之一，結合的滲透(permeation)及蒸發(vaporation)兩種不同分離程序。其滲透蒸發示意圖如圖2-4，其混合物進料是以液體形式與膜材接觸，下游利用抽真空降壓的方式提供驅動力，使進料透過膜材，並在下游以氣體形式離開薄膜，利用混合物在膜材內擴散及吸附性的差異來達到成分選擇的目的。

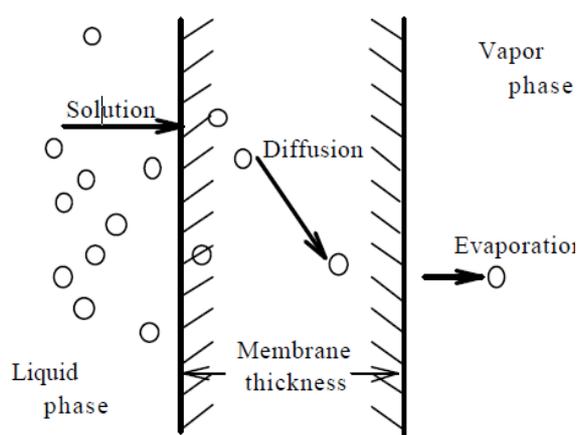


圖 2-4 滲透蒸發示意圖

在滲透蒸發的質傳機制研究中，許多學者主要都引用吸收擴散機制(sorption-diffusion mechanism)(Graham et al.,1996,Baker et al.,1995)，其基本理論為透過物分為下列三大步驟完成質傳機制：第一部分為液體進料吸收進入薄膜，第二部分為透過物吸附至薄膜內擴散，第三部分為透過物在下游以氣體的形式脫附離開膜材。

滲透蒸發膜材效能有兩個重要的指標，一為通量(Flux)，二為選擇比(separation factor)。通量越大表示膜材在單位時間內所收集到的透過物越多，而選擇比越大表示單位時間內收集到的透過物中含欲選擇的成分越多。因此，研究如何提高膜材之通量和選擇比是研究滲透蒸發程序中最重要之課題。

(1) 通量(flux):

$$J = \frac{W}{A \times t}$$

其中J為通量(g/m<sup>2</sup>/h)，W 為物質透過薄膜之重量(g)，A 為薄膜面積(m<sup>2</sup>)，t 為操作時間(h)。

(2) 選擇比(separation factor):

其中  $\alpha$  為選擇比， $X_i$ 、 $Y_i$ 分別為欲選擇物在進料端與滲透端的重量分率。

## 2-7-2 發展歷史

此技術最早是 1917 年由 Kober 提出，利用醋酸纖維膜將甲苯的水分分離出來，但一直到 1950 年才要再度引起注意，之後滲透蒸發便開始備受矚目，發表的論文日益增加。Binning 在 1960 年開始評估滲透蒸發程序之商業化的可行性，但因為沒有發展出具有相當規模的通量以及適度選比的薄膜，滲透蒸發程序一直無法真正商業化。直到 1980 年，由 GFT 開發出 PVA(polyvinyl alcohol)以及 PAN(polyacrylonitrile)複合膜，成功的應用於無水酒精的製程，並於 1982 年在巴西設立日產 1500 升無水酒精的工廠，樹立了應用滲透蒸發程序商業化的基礎(Huang,1991)。隨後 GFT 公司陸續在西歐及美國也設立二十多座大規模工廠，到了 1991 年代中期，全世界上約有 150 套大規模滲透蒸發裝置。至目前為止，商業化的高分子膜材均為德國的 GFT 公司的產品，但近幾年來日本的 Mitsui、美國的 Artisan 及荷蘭的 Pervatech 也開始生產無機材料的滲透蒸發膜。

### 2-7-3 滲透蒸發薄膜

滲透蒸發技術核心是在於能否製造出具有優越分離效能的薄膜。滲透蒸發程序是以預分離物質透過薄膜速率之不同進行分離，而物質透膜速率決定其在膜材中之溶解性(Solubility)以及擴散系數(Diffusivity) (J.J.Shieh, 1997)。故滲透蒸發薄膜之選擇比是來自於預分離物質間分子大小的差異(影響擴散係數)以及對薄膜材料親和性之不同(溶解度影響)，因此膜材發展的重點常在於調整材料與透過物的親和性，或控制其結構來調整透過物在膜中的擴散係數。滲透蒸發薄膜之分離效能對於分離程序優劣的評定，主要由通量和對分離物種之選擇比來判定。故優質的薄膜需同時具備高通量(High flux)、高選擇比 High separation factor)以及良好的穩定性(Excellent stability)的效能，但通常彼此間存在著相互消長的性質，而武法同時兼顧。根據溶解-擴散理論(Solution-diffusion model)，透過選擇比主要決定於吸附選擇比(Solubility selectivity)和擴散選擇比(Diffusivity selectivity)。

為了有效的分離丁醇，滲透蒸發膜材質的選定就變得相當的重要，一般而言，薄膜的分離效果若是在於過濾有機物質而將水與其他粒子回流，則所選定之滲透蒸發膜除了需與有機物有較強的親和性外，亦要降低分子大小所導致的選擇比。要降低分子大小的選擇比，最簡單的方式是提高薄膜的自由體積，因此文獻上選擇有機成份的膜材主要是橡膠態(rubbery state) 的高分子— PDMS (polydimethylsiloxane)，即是所謂的silicone rubber。PDMS會選擇有機成份的原因，除了其對有機物有甚高的親和性外，其自由體積亦大於一般的玻璃態高分子。對於許多有機物的水溶液而言，PDMS的選擇比不錯，除了PDMS外，包括Silicone、 Polypropylene和polyether-block-amide等材質也是文獻中常用來做為滲透蒸發膜。

### (一) PDMS(polydimethylsiloxane)

PDMS為一矽氧聚合高分子，具有高疏水性質。物性方面，其具有低Tg溫度，所以在低溫下仍具有良好的伸縮可塑性，而在 250°C 以下，也保有良好的熱穩定性。此外，其介電強度(dielectric strength)、防水性等都非常良好，以商業用途相當廣泛，如接著劑、填充劑、絕緣材料、表面處理等應用。在於至成薄膜而應用於分離程序方面，因為其具有高疏水性質，所以常被研究應用在選擇有機物之有機和水溶液之分離(Baker et al., 1993)

PDMS(polydimethylsiloxane)，即是所謂的silicone rubber，俗稱矽膠。PDMS會選擇有機成份的原因，除了其對有機物有甚高的親和性外，其自由體積亦大於一般的玻璃態高分子。對於許多有機物的水溶液而言，PDMS的選擇性不錯，除了PDMS外，包括Silicone, Polypropylene等材質也是文獻中常用來做為滲透蒸發膜。另外於PDMS材料內加入silicalite (多孔性的silica)，可大幅提高PDMS對有機物的選擇比。

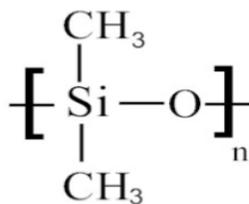


圖 2- 5 PDMS(polydimethylsiloxane)之化學結構式

### (二)PEBA(polyether-block-amide)

PEBA(polyether-block-amide)是聚醚-醯胺嵌段共聚物，是熱可塑性彈性體中的一個類型。這類的嵌段共聚物是由交替的多嵌段所組成。PEBA是具有疏水性薄膜。PEBA薄膜已被許多學者研究，因為PEBA薄膜對於芳香烴及其衍生物表現出較高的選擇性芳香烴(Aromatic Hydrocarbons)及其衍生物，如苯酚和苯胺

(K.W. Böddeker G. B., 1990)。

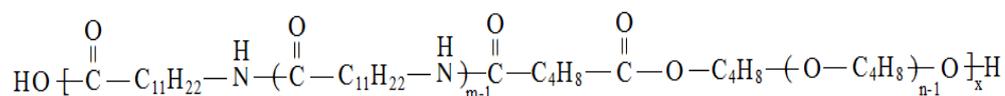


圖 2-6 PEBA(polyether-block-amide)之化學結構式

#### 2-7-4 滲透蒸發膜應用於丁醇發酵

ABE 發酵是個歷史悠久的發酵製程，但自從 1960 年代後就不再有生物發酵丁醇的工業製程，主要原因不外乎是低濃度的丁醇產量與生產速率，以及高單價發酵基質，以及後續回收製程所帶來的低經濟競爭性。目前而言，大部分的丁醇發酵都轉向直接使用農業澱粉進行直接丁醇發酵，因此相對降低了基質的單價，且隨著全世界減碳要求，農業產品之直接發酵將會大幅的降低碳排放量，因此相當的具有相當高的競爭性。但高濃度丁醇所帶來的抑制效果，卻會降低發酵製程的生產速率。因此如何有效的降低發酵製程中丁醇濃度，將可避免丁醇對菌體的毒害效果，進而提升發酵濃度，並可有效的簡化後段回收純化的複雜度(Zanati et al., 2006)。

傳統上直接用於發酵槽的丁醇分離技術最主要的技術為氣體沖提(Gas stripping)以及利用滲透蒸發膜(Pervaporation)。氣體沖提分離方式主要是利用丁醇的高揮發性，利用氮氣(或CO<sub>2</sub>)沖提發酵槽，將發酵液中的液態丁醇轉成氣態丁醇後，再利用冷凝器將丁醇冷凝成液態進行下一階段的回收純化，而氮氣就可以再回流回發酵槽內進行往復沖提。氣提沖提方式的最大限制就在於能量的耗損，由於大量經過冷凝器的氮氣沖提發酵，會降低發酵槽的溫度，因此持續的加熱是必要的，且為了達到冷凝丁醇的目的，熱交換所需之能量相當的大，因此高能量需求降低了氣體沖提方式工業化生產之可能性。

而另一種常使用來分離丁醇的方式即為滲透蒸發薄膜(Pervaporation)的過濾效果來進行連續式丁醇分離。由於發酵製程中除了必須降低丁醇濃度以避免毒害

效應外，還得避免發酵槽操作過程中的污染問題，因此利用滲透蒸發薄膜的過濾效果來分離丁醇並使得菌體回流至發酵槽內是近年來相當受到注目的技術。

在滲透蒸發（pervaporation）技術中所使用的過濾薄膜是一道經過特殊設計的多孔膜，利用介於液相與氣相間的分隔層將液態的丁醇轉換成氣態丁醇，且分離過程中不需使用高溫，只利用薄膜兩側的壓力差使液相進入薄膜內，進一步氣化成氣體而脫離原本的發酵液造成分離現象。由於不需使用高溫，因此能量耗損相對來的低，這也是滲透蒸發技術與傳統分離系統最大的差異。此外，相較於傳統的蒸餾分離系統是以氣—液平衡做為分離的基礎。滲透蒸發的選擇比是來自於待分離物質間分子大小的差異。以及對薄膜材料親和性的不同。

滲透蒸發的分離機構可分為三個步驟：混合液與薄膜表面接觸，並依照進料物種的化學活性與對薄膜親和性的不同，造成進料物質可以溶解進入膜內；藉著進料分子本身的大小、形狀，以及過濾物和膜材親和性所造成擴散速率的差異，進而擴散通過薄膜；當滲透物質擴散透過膜材後，因為整體過濾系統維持在低壓狀態下，因而滲透物質仍舊是以氣態方式呈現，經過一組冷凝器後再凝結成液態。

由於丁醇發酵時，菌體發酵液相當的複雜，除了有丁醇、丙酮還有乙醇，甚至包含許多細胞碎片，胞內蛋白質等等因此滲透蒸發膜應用於實際發酵工業化分離丁醇的範例還不甚普遍，但隨著丁醇發酵的重要性日漸增高，利用滲透蒸發膜來達到有效的分離應該是未來的一個趨勢。

## 2-8增加丁醇產量的發酵策略

### (一) 提高丁醇濃度耐受菌種之篩選

由於丁醇對細胞的毒性，造成發酵液中丁醇的含量難以達到較高的濃度，進一步降低了終端溶劑產率。因此提高發酵菌種對丁醇的耐受性，是提高溶劑產率的先決條件。然而，由於丁醇造成細胞毒性的原因相當的複雜，且尚未有一定的

推論，因此篩選耐高濃度丁醇菌種難度極高。文獻曾經指出利用降低細胞自體溶解酵素活性(lysisactivity)，可以有效增加細胞對丁醇的耐受性。利用氯黴素前處理丁醇發酵菌株，使得自溶現象降低40%，丁醇的終端濃度就可以提高了30%。另外有些作者認為，原生質體融合是一種提高菌種對丁醇耐受性的好方法，將高耐受丁醇的菌和丙丁菌進行融合，理論上可能篩選到高丁醇耐受性的高產量菌種(Dolly et al.,2000)。

## (二) 高丁醇比例菌種的選育

一般ABE發酵中，產物丙酮、丁醇、乙醇的比例大約為3:6:1，而實際上需要更高比例的有更廣泛用途的丁醇。隨著基因工程及代謝工程的發展，人們可以在現有研究的基礎上進一步闡明代謝過程的限速酶，解除代謝過程中可能存在的產物或者中間產物的抑制，從而使得丙酮丁醇發酵快速高效的進行。強化丁醇生產中的關鍵酶，如acetoacetyl-CoA:acetate/butyrate:CoA transferase、丁醛脫氫酶等，強化丁醇的生成代謝，是提高丁醇比例的較好方法。另外，利用基因工程的方式直接剔除乙醛脫氫酶基因，降低代謝通量走向乙醇生成路徑，進而減少acetyl-CoA 的消耗，也可以提高丁醇於總產出溶劑間的比例。(Blaschek,1991)

## (三) 結合發酵製程與分離純化技術

傳統的丁醇發酵生產製程，一般使用蒸餾方式來達到產物的分離純化目的，然而這需要消耗大量的能量，造成整體生產成本提高，而且採用蒸餾純化方式並無法直接與丁醇發酵槽連結，因而無法及時的降低發酵槽內的丁醇濃度，進而降低丁醇對菌體的毒性影響。倘若能夠使用新型低耗能的分離方式，必將大大降低生產成本。文獻指出滲透蒸發(pervaporation)等分離技術的應用，是相當有未來發展的潛力(Huang et al.,2001)。

表 2-4 比較不同滲透蒸發薄膜之 Butanol flux 和 Separation factor

Membrane type	Feed solution	Butanol flux (g/m <sup>2</sup> /h)	Separation factor( $\alpha$ )	Referenece
PDMS (PERVAP-1060)	ABE solution	18	18.9	A. Jonquieres et al. (1997)
PDMS (PERVAP-1070)	ABE solution	16	21.7	A. Jonquieres et al. (1997)
Silicalite filled PDMS	ABE solution	414	49	J.C. Huang et al. (2001)
Liquid membrane	ABE solution	54	245	A. Thongsukmak et al. (2007)
PEBA	ABE solution	6.6	12.4	F.F. Liu et al.(2005)
PTFE	ABE solution	98	9.5	D.L. Vrana et al. (1993)
PDMS/ceramic	ABE solution	181	18.4	Gongping Liu et al.(2011)
Silicalite filled PDMS	ABE fermentation broth <sup>*</sup>	48	97.3	N. Qureshi et al. (2001)
Liquid membrane	ABE fermentation broth <sup>*</sup>	31	197	A. Thongsukmak et al. (2007)
PDMS/ceramic	ABE fermentation broth <sup>*</sup>	163	16.2	Gongping Liu et al.(2011)
PDMS	ABE fermentation broth <sup>**</sup>	-	9.3~18.8	N. Qureshi et al. (1999)
PP	ABE fermentation broth <sup>**</sup>	0.5~8.1	2.6~6	N. Qureshi et al. (1992)
Liquid membrane	ABE fermentation broth <sup>**</sup>	3.3	66	M. Matsumura et al.(1992)
PDMS/ceramic	ABE fermentation broth <sup>**</sup>	48.2	15.1	Gongping Liu et al.(2011)

<sup>\*</sup> Cells-free or spent ABE (Acetone-Butanol-Ethanol) fermentation broth

<sup>\*\*</sup> ABE fermentation-Pervaporation(PV) coupled process

### 第三章 實驗材料與方法

#### 3-1 實驗材料

##### 3-1-1 實驗菌株

本研究所使用的菌株為購自生物資源保存及研究中心，菌種編號為 BCRC 10639 之 *Clostridium acetobutylicum*。

##### 3-1-2 實驗藥品

表 3-1 實驗藥品

中文名	英文名	廠牌
鉬酸鈉	Sodium molybdate dehydrate	昭和化學株式會社
硫酸鈉	Sodium sulfat	聯工
硫酸銅	Cupric sulfate	SHOWA
硫酸錳	Manganese sulfate monohydrat	SHOWA
硫酸鎂	Magnesium sulfate monohydrat	SHOWA
硫酸鋅	Zinc sulfate hepahydrate	SHOWA
硫酸	Sulfuric acid	SHOWA
磷酸氫二鉀	Dipotassium hydrogenphosphat	SHOWA
對氨基苯甲酸	p-aminobenzoic acid	MP Biochenical
生物素	Biotin	SHOWA
氯化鈣	Calcium dichloride dehydrate	SHOWA
氯化鈷	Cobalt dichloride dehydrate	SHOWA
氯化鐵	Ferric chlorid	SHOWA
醋酸	Acetic acid	SHOWA
丁酸	Butyric acid	Riedel-de Haen
乙醇	Ethanol	景明
丁醇	Butanol	KANTO

中文名	英文名	廠牌
甘油	Glycerol	KANTO
鹽酸	Hydrochloric Acid	Scharlau
氫氧化鈉	Sodium Hydroxid	SHOWA
胰化蛋白朊	Tryptone	DIFCO BD
酵母萃取物	Yeast Extract	DIFCO BD
RCM	Reinforced Clostridial Medium	DIFCO BD
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
顆粒狀活性碳	Granular Activated Carbon	
PDMS	Poly dimethyl siloxan	信越化學工業株式會社
硬化觸媒	Cuing agent	信越化學工業株式會社
甲苯	Toluene	-
PEBAX2533	PEBAX2533	Atofina

### 3-2 實驗儀器

表 3- 2 實驗儀器

儀器設備	型號	廠牌
pH meter	PH-206	Lutron
電子天平	BJ100M	Precisa
磁石攪拌加熱器	MS-3205B	Chrom Tech
高壓蒸氣滅菌釜	EA635	TRIDENT
無菌操作台	3BH-24	海天
分光光度計	GENESYS 10UV	Thermo
氣相層析儀	Focus GC	Thermo
葡萄糖分析儀	2300STAT	YSI
恆溫震盪培養箱	LUS-15	亮盛
高速中型離心機	Universal-32R	Hettich
超純水製造機	Simplicity	MILLPORE
微電腦蒸餾水製造機	WSC044	FISTREEM
試管震盪器	MS1 minishaker	IKA
5 L 液態發酵槽	BTF-A 5L	頂生
烘箱	LO-150	亮盛
超音波震盪器	DC300H	DECTA
滲透蒸發薄膜設備	-	膜旺
陶瓷過濾模組	Pore size 0.1 $\mu$ m	精良準

### 3-3 分析方法

#### 3-3-1 Biomass 分析法

將發酵液以適當濃度稀釋後，利用分光光度計在波長620 nm 下測量其光學密度(Optical density, O.D.)。取1 ml 發酵液離心去除上清液，放入60 °C 烘箱烘乾24 hr，測得菌體乾重(Dry cell weight, DCW)。依各個時間點所量測的DCW 和 O.D.值作圖，即可獲得DCW 與O.D.值間的關係:

菌體乾重檢量線方程式： $DCW(g/l)=(O.D.-0.0258)/0.6796$  (附錄 1)

#### 3-3-2 Glucose 分析方法

將發酵液以離心機離心 (9000 rpm, 5 min)，取上清液利用純水做10 倍稀釋使用YSI 1500 Sport L-Lactate analyzer 進行量測。

#### 3-3-3 GC 分析方法

將菌液經離心機離心後所得之上清液取出，並以二次去離子水做10 倍稀釋，使用氣相層析儀 (Thermo model Focus GC series with FID detector) 並藉由毛细管柱SEG BP20(25 m × 0.22 mm, 0.25 μm)，起始溫度120 °C，維持3分鐘後以16 °C /min 之速率升溫至200 °C，維持5 min；注射孔(injector)溫度200 °C；偵測器為火焰離子偵測器(FID detector) 溫度250 °C；運送氣體(carrier gas)為氮氣，氣體流量 25 ml/min。注射體積為 1 μl。

波峰面積和代謝產物濃度作圖，獲得檢量線:

丙酮 (acetone) 檢量線方程式： $Concentration(g/l)=area/481371$  (附錄 2)

乙醇 (ethanol) 檢量線方程式： $Concentration(g/l)=area/493603$  (附錄 3)

丁醇 (butanol) 檢量線方程式： $Concentration(g/l)=area/815976$  (附錄 4)

乙酸 (acetic acid) 檢量線方程式： $Concentration(g/l)=area/307473$  (附錄 5)

丁酸 (butyric acid) 檢量線方程式： $Concentration(g/l)=area/472142$ (附錄 6)

### 3-4 實驗方法

#### 3-4-1 菌種保存

將購自菌種中心的 *Clostridium acetobutylicum* BCRC 10639 (同等於 ATCC 824) 之冷凍乾燥管，接至RCM (reinforced clostridialmedium) 液態培養基活化，並放入含有厭氧產氣包之厭氧罐中，在37 °C 恆溫培養箱內進行厭氧培養72 hr。取0.8 ml 菌液和0.2 ml 甘油於微量離心管中均勻混合，通入含有50 %CO<sub>2</sub> 和50 % N<sub>2</sub> 之混合氣體後，放至-20 °C 冰箱保存。

#### 3-4-2 種子培養基配製(Seed medium, SM)

配製濃度為38 g/L 的RCM (reinforced clostridial medium) 液態培養基50 ml，攪拌均勻且調至pH 6.8 後，置入玻璃試管並用通氣栓將瓶口塞緊，再以紙杯覆蓋其上，放到滅菌釜中殺菌20 min (操作壓力為1.2 kg/cm<sub>2</sub>，溫度為121 °C)。待培養基滅菌完取出，以75 %酒精噴灑殺菌後，放到無菌操作台中靜置冷卻；取保存於-20 °C 的冷凍種菌進行heat-shocked (70 °C，2 min)，將其倒至培養基並放入含有厭氧產氣包之厭氧罐中，送至恆溫培養箱以37 °C 進行厭氧培養30 小時。

**表 3- 3 RCM 培養基**

Compounds	Concentration(g/L)
Lab-lemco powder	10
Peptone	10
Soluble starch	1
Glucose	5
Cysteine · HCl	0.5
NaCl	5
CH <sub>3</sub> COONa	3
Agar	0.5
Yeast extract	3

### 3-4-3 發酵培養基配製(Fermentation medium, FM)

依下列藥品比例配置好所需的培養基，均勻攪拌且以1N HCl 調整pH 至4.8 後，各取25 ml 倒入玻璃試管中，用通氣栓將瓶口塞緊，再以紙杯覆蓋其上，放至滅菌釜中殺菌20分鐘，待培養基滅菌完取出，並以75 %酒精噴灑殺菌後，放到無菌操作台中靜置冷卻。

**表 3- 4 發酵培養基**

Compound	Concentration(g/L)
Tryptone	1
Yeast extract	5
Glucose	80
Biotin	0.01
p-aminobenzoic acid	0.01
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.18
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.175
Mineral salt solution	1 mL

**表 3- 5 Mineral salt solution 組成**

Compound	Concentration(g/L)
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.24
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.24
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.5
FeCl <sub>3</sub>	16.2
CuSO <sub>4</sub>	0.159
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.516
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.7
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	24.6
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (6M)	28 mL

#### 3-4-4 接菌

含有SM與FM之玻璃試管以75 %酒精噴灑滅菌後，置入無菌操作台。取2.5ml的SM 加至FM 後，通入混合氣體(50 %CO<sub>2</sub> 和50 %N<sub>2</sub>)並放置恆溫振盪培養箱中，以37 °C 進行培養。

### 3-5 實驗架構

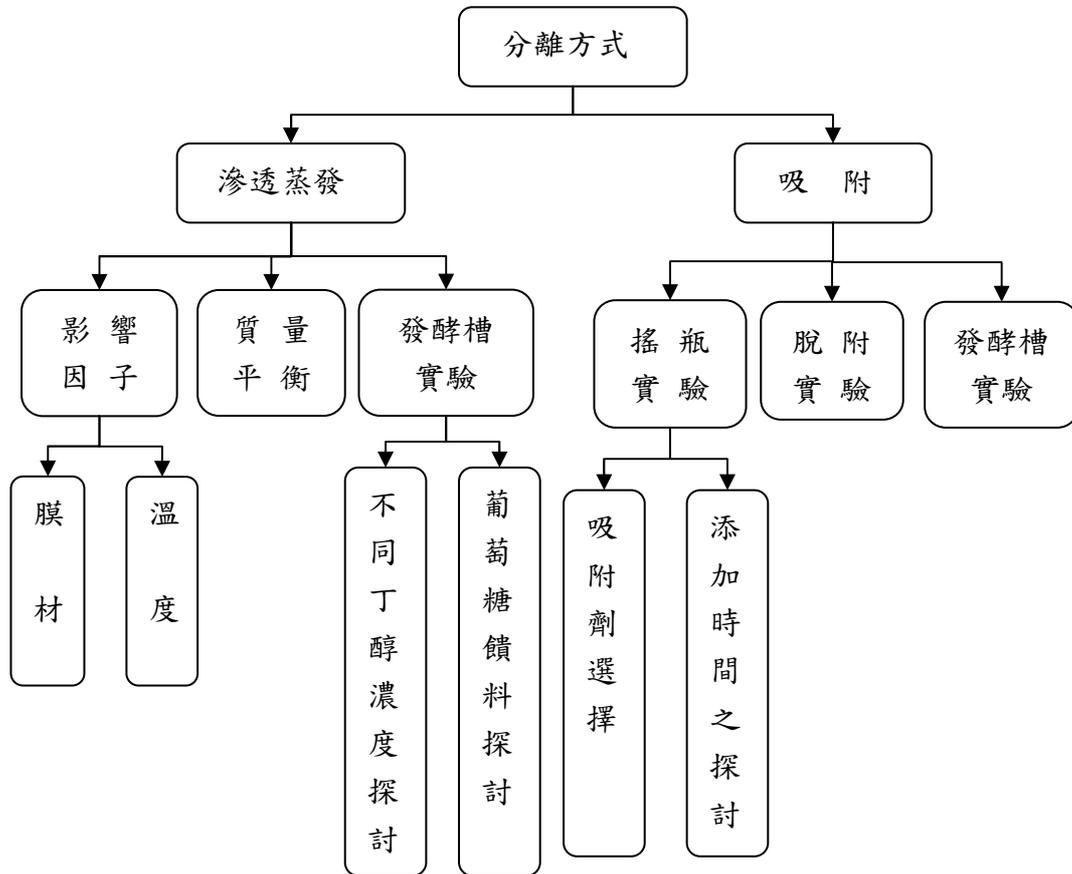


圖 3-1 實驗架構

### 3-6 實驗步驟

#### 3-6-1 5-L 攪拌式發酵槽之批次發酵

- (1) 前培養 SM 培養液。
- (2) 以 10% 接菌量將 SM 接入 1 L FM 發酵培養基中培養。  
(培養條件:溫度=37°C，轉速=100 rpm，通入混合氣保持厭氧狀態)。
- (3) 總培養時間為 60 小時。

#### 3-6-3 吸附劑之選擇

目的：探討不同吸附劑 PE(Polyethylene)、PC(Polycarbonat)、PLA(Poly lactic acid)、AC(Activated carbon) 對吸附丁醇能力。

- (1) 配置 15 g/L 丁醇溶液 30 mL 至離心管中，並以 1 N HCl 調整至 pH=4.8。
- (2) 分別將 PE、PC、PLA、AC 以 1.5 g 加入至上述離心管中，並置於 37°C 恆溫水槽中。
- (3) 分別於 0、1、3、5、10、15、30、60 分鐘取樣。
- (4) 將上述不同時間之樣品，以 GC 分析之丁醇濃度分析。

#### 3-6-4 脫附率之探討

目的：探討 AC 之脫附丁醇能力。

- (1) 將以吸附溶劑之活性碳加入 10 ml 去離子水。
- (2) 以溫度 140 ~ 150 °C 的油浴方式進行脫附程序。
- (3) 利用冷凝管將溶劑收集。
- (4) 利用 GC 進行分析。

### 3-6-5 不同時間添加活性碳於發酵搖瓶探討

目的：探討不同時間添加活性碳於發酵搖瓶中生產丁醇之影響。

- (1) 前培養 50 ml SM 培養基，培養 30 小時。
- (2) 以 10% 接菌量將 SM 接至 25 ml FM 培養基中。
- (3) 分別在發酵時間 0、12、24、36 和 48 小時加入 5 g 活性碳於發酵搖瓶中。
- (4) 總培養時間為 72 小時。

### 3-6-6 發酵液經由微過濾去除菌體後進行活性碳吸附程序

目的:利用微過濾模組去除菌體進行活性碳吸附丁醇探討對於生產丁醇之影響。

- (1) 前培養 200 ml SM 培養液，培養 30 小時。
- (2) 以 10% 接菌量將 SM 接入 1 L FM 發酵培養基中培養，(培養條件:溫度=37 °C,轉速=100 rpm)。
- (3) 在發酵 24 小時之後，將發酵槽中之發酵液以流速 40 ml/hr 導入微過濾模組當中進行菌體與發酵液之分離，含有菌體之發酵液將流回發酵槽中，而澄清發酵液將流入含有 150 g 顆粒狀活性碳之吸附裝置中。
- (4) 總吸附過程為 1 小時，之後將發酵液導回發酵槽中以結束活性碳吸附程序，並繼續維持發酵程序。
- (5) 總發酵時間為 72 小時。

### 3-6-7 發酵液直接進行活性碳吸附程序

目的: 探討發酵液直接進行活性碳吸附丁醇其生產丁醇之影響。

- (1) 前培養 200 ml SM 培養基，培養 30 小時。
- (2) 以 10% 接菌量將 SM 接入 1 L FM 發酵培養基中培養，(培養條件:溫度=37 °C,轉速=100 rpm)。
- (3) 當發酵 24 小時後，將發酵液直接導入 150 g 顆粒活性碳之吸附裝置進行 1 小時吸附程序。
- (4) 總發酵時間為 72 小時

### 3-6-8 PDMS 薄膜製作

- (1) 配置 3 克 PDMS 高分子和 0.3 克固化劑至 100 ml 燒杯中。
- (2) 加入 10 ml 的甲苯至上述燒杯中，加入磁石攪拌約 1 小時。
- (3) 將配置好之溶液放置在晶圓片上，利用塗佈棒將溶液均勻地塗佈在晶圓上。
- (4) 將塗佈好的溶液放置在室溫下靜置約 1 小時，使溶液中之氣泡完全去除。
- (5) 放置真空烘箱約 3 小時，使溶劑完全揮發。
- (6) 將製作好之 PDMS 薄膜利用 Mitutoyo digital micrometer 測定其膜厚約為  $50\mu\text{m} \pm 10\mu\text{m}$ 。

### 3-6-9 PEBA 薄膜製作

- (1) 配置 1 克 PEBAX2533 高分子和 19 克丁醇至 100 ml 血清瓶中，在 80°C 下加入磁石攪拌約 2 小時。
- (2) 將配置好之溶液放置在晶圓片上，利用塗佈棒將溶液均勻地塗佈在晶圓上。
- (3) 將塗佈好的溶液放置在室溫下靜置約 24 小時，使溶液中之氣泡完全去除。
- (4) 放置真空烘箱約 24 小時，使溶劑完全揮發。
- (5) 將製作好之 PEBA 薄膜利用 Mitutoyo digital micrometer 測定其膜厚約為  $50\mu\text{m} \pm 10\mu\text{m}$ 。

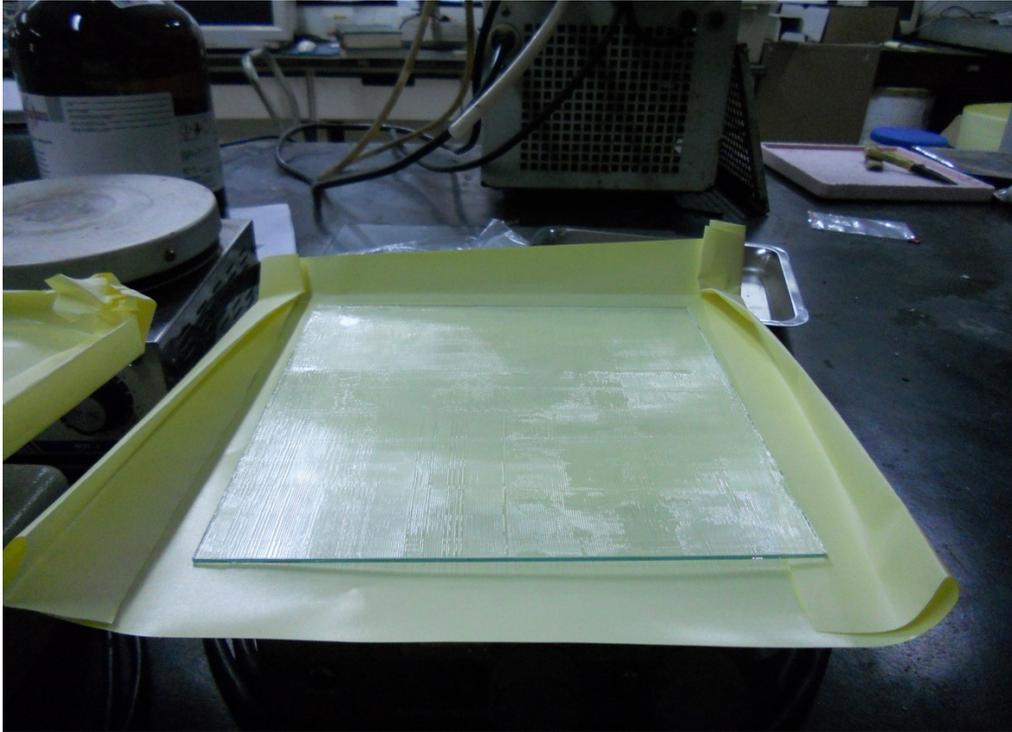


圖 3-2 以 PDMS 製作出來之滲透蒸發薄膜放置在玻璃片上



圖 3-3 利用 PEBA 製作出來之滲透蒸發薄膜

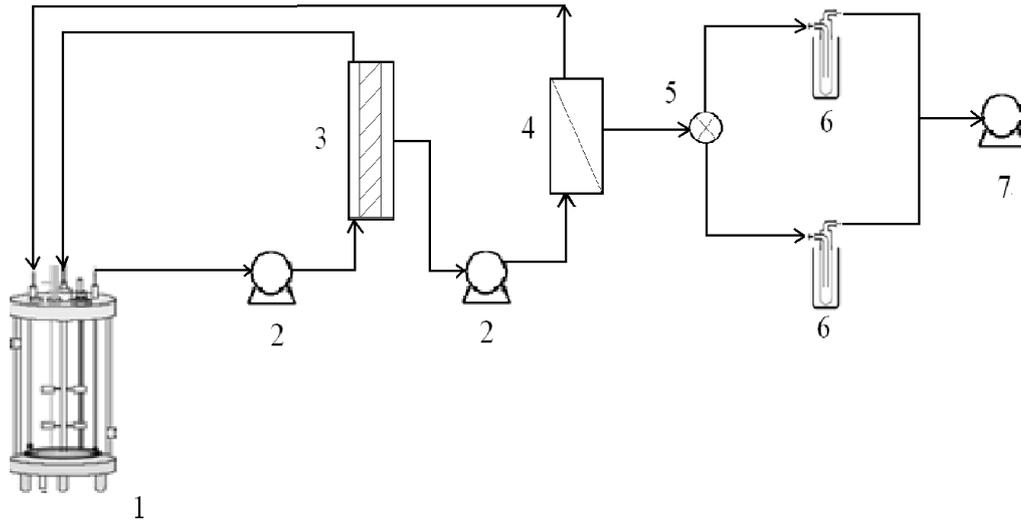


圖 3-4 滲透蒸發系統串聯發酵槽流程圖

1.5 L 發酵槽；2. 幫浦；3. 陶瓷過濾模組；4.滲透蒸發薄膜；5.三向閥；6.cold trap ；7.真空幫浦

### 3-6-10 滲透蒸發膜材之選擇

目的: 探討不同滲透蒸發膜材對移除溶液中丁醇之影響

- (1) 配置 8 g/L 丁醇、4 g/L 丙酮、1.33 g/L 乙醇、3.5 g/L 乙酸和丁酸之模擬溶液 1000 ml。
- (2) 將上述溶液倒入 加熱夾套中 加熱至 37°C。
- (3) 分別用 PDMS 以及 PEBA 薄膜,其薄膜有效面積為 0.08 m<sup>2</sup>、厚度為 50 μm；  
開啟循環幫浦以 40 ml / min 的流速將溶液從加熱夾套導入 PV 系統中循環。
- (4) 開啟真空 pump 並開始計時，在每 30 分鐘分別在收集瓶和加熱槽中取樣並紀錄其體積，總操作時間為 480 分鐘。
- (5) 收集之樣品進行 GC 分析。

### 3-6-11 滲透蒸發系統(PV)之操作溫度選擇

目的: 探討不同操作溫度(37、50、60 °C)對移除丁醇量之影響。

- (1) 配置 8 g/L 丁醇、4 g/L 丙酮、1.33 g/L 乙醇、3.5 g/L 乙酸和丁酸之模擬溶液 1000 ml。
- (2) 將上述溶液倒入 加熱夾套中 分別加熱至 37、50、60 °C。
- (3) 以有效面積 0.08 m<sup>2</sup> 和厚度 50 μm 之 PEBA 當作滲透蒸發薄膜；開啟循環幫浦以 40 ml / min 的流速將溶液從加熱夾套導入 PV 系統中循環。
- (4) 開啟真空 pump 並開始計時，在每 30 分鐘分別在收集瓶和加熱槽中取樣並紀錄其體積，同時補充上述各種物質以維持初始濃度；總操作時間為 8 小時。
- (5) 收集之樣品進行 GC 分析。

### 3-6-12 滲透蒸發系統之質量平衡

目的:探討槽體中溶劑移除量與滲透端溶劑收集量是否達到質量平衡。

- (1) 配置 8 g/L 丁醇、4 g/L 丙酮、1.33 g/L 乙醇、3.5 g/L 乙酸和丁酸之模擬溶液 1000 ml。
- (2) 將上述溶液倒入 加熱夾套中 加熱至 37°C。
- (3) 以有效面積 0.08 m<sup>2</sup> 和厚度 50 μm 之 PEBA 當作滲透蒸發薄膜；開啟循環幫浦以 40 ml / min 的流速將溶液從加熱夾套導入 PV 系統中循環。
- (4) 開啟真空 pump 並開始計時，在每 30 分鐘分別在收集瓶和加熱槽中取樣並紀錄其體積，總操作時間為 8 小時。
- (5) 收集之樣品進行 GC 分析。

### 3-6-13 不同丁醇濃度進行滲透蒸發之探討

目的:探討發酵槽中在不同丁醇濃度(4±1、7±1、10±1 g/L)時進行滲透蒸發系統移除對生產丁醇之影響。

- (1) 前培養 250 ml SM 培養基，培養 30 小時。
- (2) 以 10% 接菌量將 SM 接至 2500ml FM 培養基中。
- (3) 通入混合氣體 (50% CO<sub>2</sub> 和 50% N<sub>2</sub>) 維持厭氧環境，培養條件為溫控 37°C、轉速: 105 rpm、起始 pH 4.8。
- (4) 當發酵槽內丁醇濃度分別達到 4±1、7±1、10±1 g/L 時，將發酵液利用循環幫浦以 40 ml / min 的流速導入陶瓷過濾模組進行菌體過濾。
- (5) 澄清發酵液流入 PV 系統開始進滲透蒸發移除產物程序，總操作時間為 8 小時。
- (6) 結束滲透蒸發移除程序後，繼續發酵至第 60 小時結束本實驗。

#### **3-6-14 結合滲透蒸發與連續饋料對生產丁醇之探討**

目的:探討在滲透蒸發與同步連續饋料對生產丁醇之影響

- (1) 前培養 250 ml SM 培養基，培養 30 小時。
- (2) 以 10% 接菌量將 SM 接至 2500ml FM 培養基中。
- (3) 通入混合氣體 (50% CO<sub>2</sub> 和 50% N<sub>2</sub>) 維持厭氧環境，培養條件為溫控 37°C、轉速: 105 rpm、起始 pH :4.8。
- (4) 當發酵槽內丁醇濃度分別達到 7±1 g/L 時，將發酵液利用循環幫浦以 40 ml / min 的流速導入陶瓷過濾模組進行菌體過濾。
- (5) 澄清發酵液流入 PV 系統開始進滲透蒸發移除產物程序，同時開始進行饋料，饋料濃度為 50 % (w/v) ，饋料流速為 15 ml/hr，滲透蒸發與饋料操作時間同為 24 小時。
- (6) 結束 24 小時的滲透蒸發移除程序與饋料程序後，繼續發酵至第 84 小時結束本實驗。

## 第四章 結果與討論

### 4-1 5-L 攪拌式發酵槽之批次發酵程序

實驗結果如圖 4-1 所示，在發酵 42 小時後，丁醇濃度達 12 g/L 左右，此濃度正與文獻中所提到的抑制 *C. acetobutylicum* 之丁醇濃度 12~16 g/L 相符，而引發抑制現象並造成發酵槽中的葡萄糖不在被菌體利用，使丁醇濃度在 36 小時之後維持在定值，而不再持續上升。

接下來的實驗，將利用分離程序結合在丁醇發酵生產製程，來達到產物的分離純化目的，降低發酵槽內的丁醇濃度，進而降低丁醇對菌體的毒性影響。若能夠使用新型低耗能的分離方式，必將大大降低生產成本。為了迎合現在節能減碳的低碳社會，吾人將利用吸附(adsorption)和滲透蒸發(pervaporation)這兩項分離技術，探討其應用在 *C. acetobutylicum* 生產丁醇之潛力。

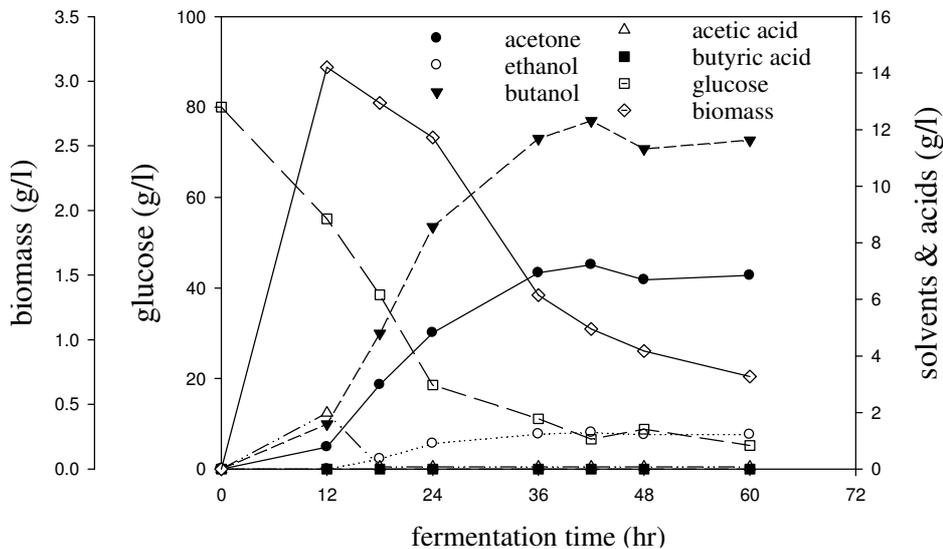


圖 4-1 菌體、葡萄糖及 ABE 濃度在 5 L 發酵槽之批次發酵的發酵情形

## 4-2 吸附實驗

### 4-2-1 吸附物選擇

本實驗利用 PE(Polyethylene)、PC(Polycarbonat)、PLA(Poly lactic acid)、AC(Activated carbon) 4 種不同的吸附材料，探討其在溶液中吸附丁醇能力之測試。由實驗結果如圖 4-2，使用 4 種不同的吸附材料，其吸附能力以 AC 較為顯著，其吸附能力為 0.042 g / g AC，高出其他吸附材料之吸附能力許多，因此本研究選用活性碳作為吸附劑來探討後續的實驗。

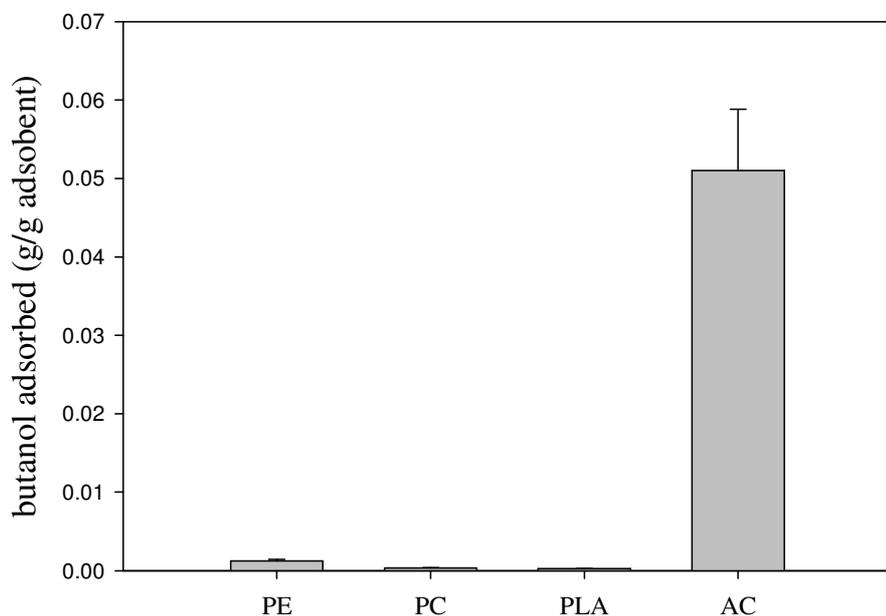


圖 4- 2 PE、PC、PLA 和 AC 之吸附丁醇能力比較

#### 4-2-2 脫附實驗

為了了解實際活性碳回收率，設計了脫附實驗。從下表結果數據 acetone、butanol 和 ethanol 經由高溫油浴下脫附並冷凝回收，其 acetone、butanol 和 ethanol 脫附率分別為 99.2、98.07 和 99.4 wt%，大部分的溶劑都能被回收；由此脫附實驗，未來可應用在發酵槽中溶劑總產量的推算。

表 4- 1 A-B-E 在顆粒狀活性碳之脫附能力

Components	adsorption weight(m g)	Desorption weight (m g)	Desorption (wt%)
Acetone	4.12	4.09	99.20
Butanol	6.23	6.11	98.07
Ethanol	1.88	1.87	99.40

### 4-2-3 添加活性碳於發酵液之時間點探討

由於顆粒狀活性碳擁有強大的吸附能力，對於許多化合物都具有吸附性，因此對於加入活性碳至發酵液中之時間點，來吸附目標物丁醇相對地就變得非常重要。但由圖 4-3 中，其結果顯示有添加活性碳之 FM 搖瓶相較於無添加活性碳之 FM 搖瓶，其無添加活性碳的 ABE 產量遠高於有添加活性碳之搖瓶，其中以 0 小時添加之搖瓶最為明顯(如圖 4-4)，在發酵 12 小時之後，0 小時添加活性碳之搖瓶中，溶液從原本黃褐色變成透明無色，推測其可能是活性碳放入於搖瓶中，吸附其搖瓶中之碳氮源和營養源，使其菌體無法取得生長代謝所必需之物質而死亡，甚至可能是由於活性碳在吸附丁醇後，吸附丁醇的活性碳還是放置在發酵搖瓶中，並沒有達到移除丁醇的效果，對於菌體還是造成了毒害的影響，導致菌體生理代謝機制被限制了而不再繼續生成其產物。

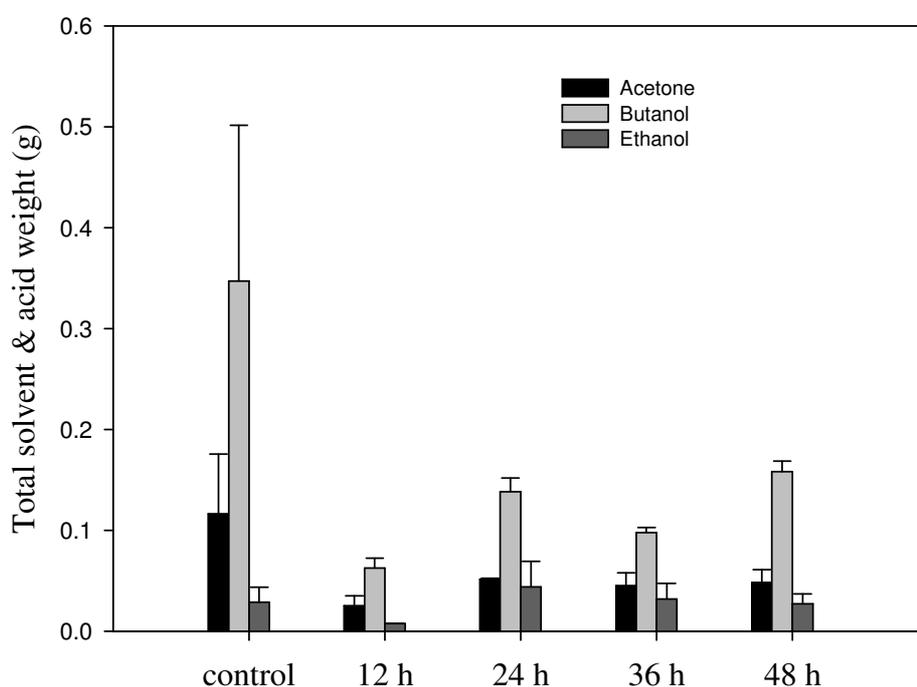


圖 4- 3Total A-B-E 生產在不同時間添加顆粒狀活性碳於搖瓶批次發酵之發酵情形

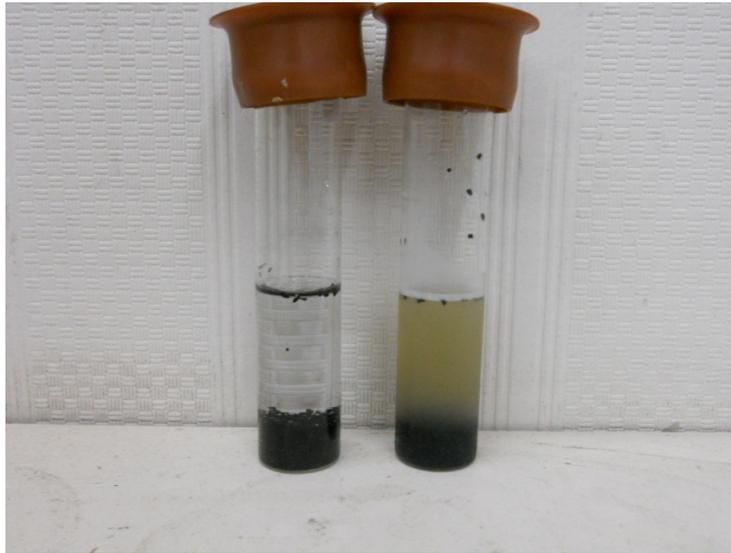


圖 4-4 添加活性碳於發酵液之時間點探討:左邊為 0 小時添加活性碳、右邊為 12 小時添加活性碳

#### 4-2-4 發酵液經由微過濾去除菌體後進行活性碳吸附程序

為了避免菌體直接接觸到活性碳，本次實驗利用了微過濾模組串聯 5-L 發酵槽，進行菌體過濾後的吸附程序。當發酵至 24 小時，發酵槽中之丁醇濃度達 7~8 g/L 左右，經由微過濾模組過濾菌體後開始進行活性碳吸附程序，結果如圖 4-5 中，發酵液經由活性碳吸附裝置，丁醇濃度 7.34g/L 降至 4.42 g/L，且丙酮濃度也從 5.53g/L 降至 4.60 g/L，溶劑經過吸附程序後濃度已大幅下降，但後續發酵槽內的葡萄糖濃度速率及產物生成速率，卻無因為活性碳吸附降低溶劑對菌體的毒害效應而有所改善的效果，反而造成負面效應，在還有碳源的供應下，丁醇濃度只從 4.42 g/Lg 上升至 5.96 g/L 後而便無持續生產，表示出菌體沒有繼續生長代謝，初步推測吸附程序中，顆粒狀活性碳吸附生長代謝所需之酵素或是營養源，而造成菌體無法繼續代謝生長。

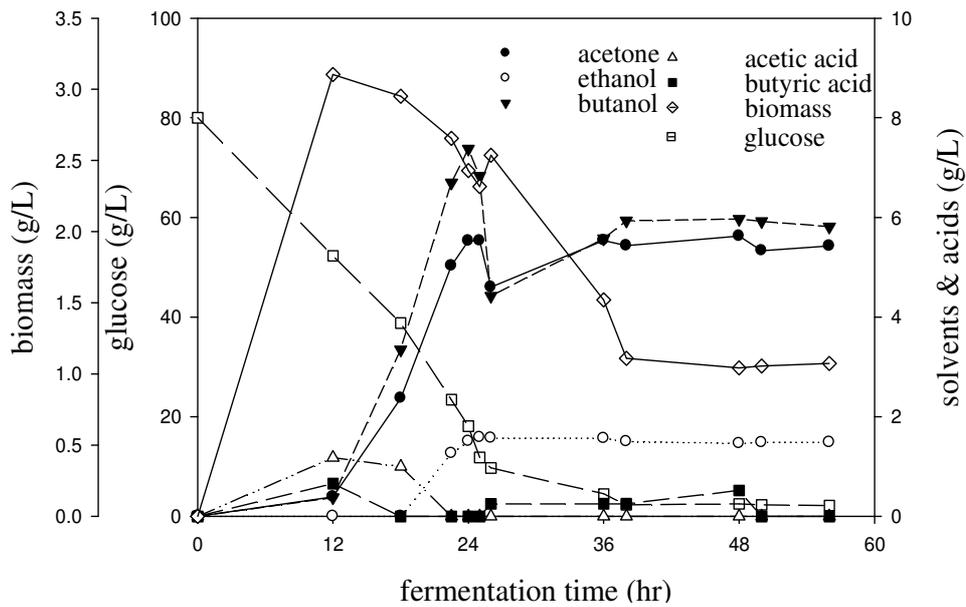


圖 4-5 菌體、葡萄糖及 ABE 濃度在 5 L 發酵槽中，在發酵 24hr 後發酵液經由微過濾去除菌體菌體後進行 1 小時活性碳吸附程序的發酵情形

#### 4-2-5 發酵液直接進行活性碳吸附程序

本實驗將微過濾模模組從設備流程中移除，直接讓發酵液導入活性碳吸附裝置，其丁醇濃度變化如圖 4-6 所示，由 7.21 g/L 明顯地降至 4.05 g/L，吸附能力約為 0.0204 g BuOH/g 顆粒狀活性碳；但經過吸附程序後，ABE 濃度及葡萄糖濃度分別無明顯地生成及消耗，表示出菌體沒有繼續生長代謝，初步推測菌體在吸附程序中，顆粒狀活性碳不僅吸附丁醇，同時也吸附菌體，使菌體滯留在活性碳孔洞中而無法回到發酵槽當中有效地利用碳源，另一可能原因在於活性碳也同時吸附生長代謝所需之體外酵素，進而抑制菌體生長。

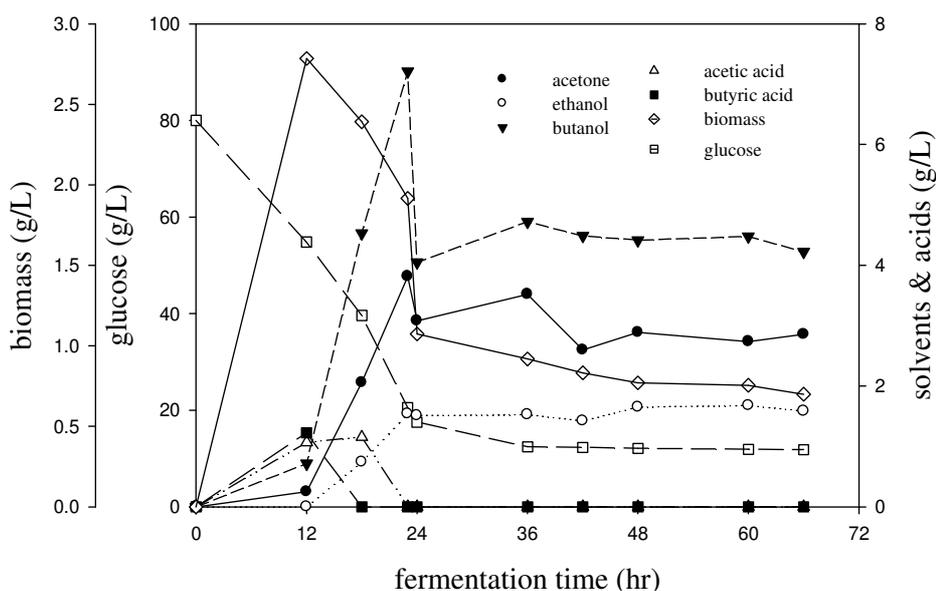


圖 4-6 菌體、葡萄糖及 ABE 濃度在 5 L 發酵槽中，在發酵 24hr 後發酵液直接進行 1 小時活性炭吸附程序的發酵情形

表 4-2 應用活性吸附碳裝置於 ABE 發酵之 Butanol produced、butanol productivity & Yield 及 Glucose utilization 比較

Method	Butanol <sup>1</sup> (g)	Glucose utilization (g)	Butanol productivity (g /l/h)	Butanol Yield <sup>2</sup> (g/g)
Batch	11.62	74.8	0.194	0.155
Adsorption without cell	8.48	68.2	0.128	0.124
Adsorption with cell	9.44	74.4	0.130	0.127

<sup>1</sup>the sum of butanol produced in the fermenter and collected in the adsorbents per working volume

<sup>2</sup>yield is defined as butanol produced per glucose consumed

表 4-3 文獻上利用吸附法應用在 ABE 發酵對 solvents productivity & yield 比較

Process	Adsorbent	Solvents productivity (g/l/h)	Solvents yield (g/g)	ref.
Batch	Polyvinylpyridine	0.92	0.32	N. Qureshi,2000
Batch(without cell)	Activated carbon	0.24	0.23	this work
Batch(with cell)	Activated carbon	0.26	0.23	this work

#### 4-2-6 總結

綜合上述吸附實驗，顆粒狀活性碳對於丁醇有相當不錯之吸附能力，由生長動力參數如表 4-2 但是應用於 *C. acetobutylicum* 生產丁醇中並無顯著提升其丁醇生產速率 (productivity) 以及碳源之利用率，反而降低其生產速率 (productivity)，初步推論可能是由於顆粒狀活性碳在吸附丁醇的同時也吸附發酵液中丁醇以外之物質，如營養物、酵素等等，如此一來會降低丁醇吸附之比例，二來吸附營養物、酵素等菌體生長代謝物質降低了 *C. acetobutylicum* 其代謝速率，而無法有效提升丁醇生產速率。且在表 4-3 為文獻與本研究結果比較，由比較結果得知，以文獻中以 Polyvinylpyridine 作為吸附劑有較高的 ABE 生產速率，而本研究利用活性碳作為吸附劑應用於 ABE 發酵，並無明顯提升其 ABE 生產速率，反而造成負面的效果，故活性碳對於應用在吸附 ABE 發酵中之丁醇並不太理想，未來可改用對丁醇有專一性吸附性且對菌體無毒害之吸附劑當作材料，來探討其吸附效果對 *C. acetobutylicum* 生產丁醇之影響。

### 4-3 滲透蒸發實驗

#### 4-3-1 滲透蒸發膜材選擇

PEBA和PDMS這兩種薄膜材料在過去一直被用在滲透蒸發系統探討移除丁醇的影響(Huang, 2001),但沒有明確的報告證實哪一種薄膜材料最適用於滲透蒸發移除丁醇。因此,藉由本實驗將利用PEBA和PDMS兩種薄膜探討在模擬溶液中丁醇移除速率的影響。實驗結果如圖4-7、4-8所示,在4 g/L丁醇、4 g/L丙酮、1.33 g/L 乙醇、3.5 g/L 乙酸和3.5 g/L丁酸之模擬溶液中,以PEBA薄膜相較於PDMS薄膜有較高的丁醇移除速率,且PEBA薄膜對於丙酮也有不錯的移除能力。由表4-4、4-5中比較PEBA和PDMS的薄膜分離效能,在初始丁醇濃度為8 g/L的模擬溶液中,PEBA薄膜有較高的丁醇移除通量和選擇比分別為9.975 g/m<sup>2</sup>/h和9.02,而PDMS薄膜分別是3.911 g/m<sup>2</sup>/h和2.03,此實驗結果利用PEBA移除丁醇通量明顯地高於文獻中(Liu.,2005)的6.6 g/m<sup>2</sup>/h,造成此種差異可能是在於薄膜厚度的不同,在本研究中所使用的薄膜只有50 μm,而文獻中的厚度是在100 μm,而另一篇文獻(Fouad,2008),當薄膜的厚度下降到30 μm,丁醇通量將同時上升的範圍為 10-20 g/m<sup>2</sup>/h,較薄的滲透蒸發薄膜具有較高的丁醇移除通量,但是在長期滲透蒸發操作下,較薄的薄膜更容易造成薄膜的損傷並導致洩漏的現象產生,故本研究中PEBA薄膜的厚度選定50 μm用於滲透蒸發進行操作。

另外值得注意的是,在丁酸移除通量中發現 PEBA 和 PDMS 薄膜分別為這是 2.449 和 2.658 g/m<sup>2</sup>/h。因此高丁酸移除通量顯示操作滲透蒸發的時機對於 ABE 發酵對於生產丁醇是相當的重要,主要是因為丁酸是形成丁醇的前驅物。在 ABE 發酵過程中分為兩階段,分別為產酸(acidogenic)階段和產溶劑(solventogenic)階段,當滲透蒸發系統產酸階段開始進行,這可能導致丁酸透過滲透蒸發系統移除,並進一步降低生產丁醇。因此,不恰當的時機進行滲透蒸發系統操作,對於 ABE 發酵生產丁醇是非常不利的。由於 PEBA 薄膜對於丁醇有較高通量和高選擇比,故採用 PEBA 薄膜作為下述實驗探討的膜材。

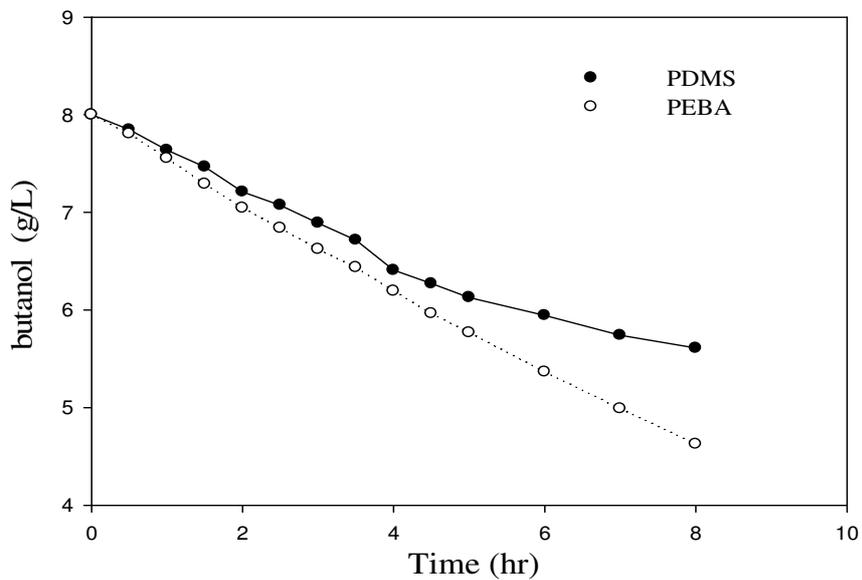


圖 4-7 比較 PEBA 和 PDMS 薄膜對移除模擬溶液中丁醇濃度之下降趨勢圖

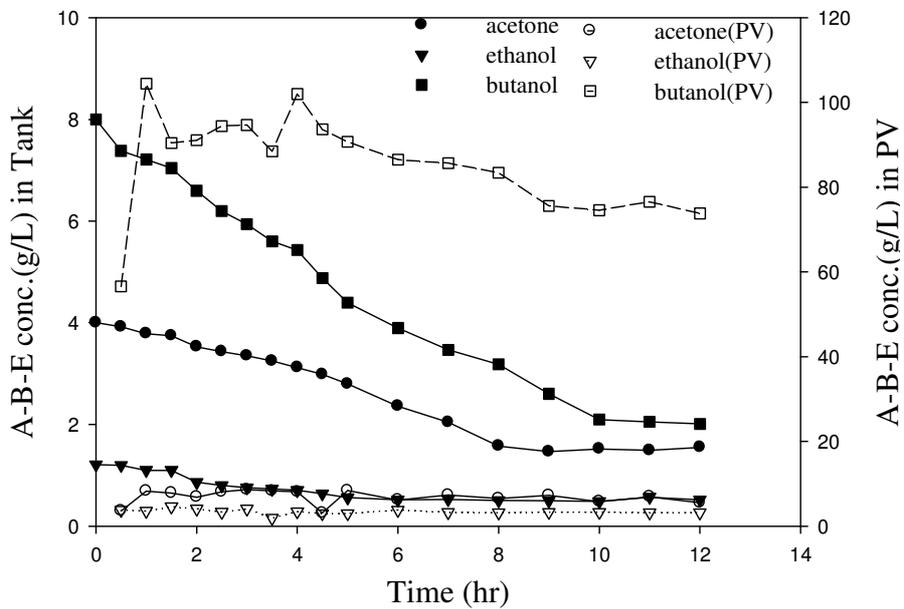


圖 4-8 利用 PEBA 薄膜進行滲透蒸發之槽內 A-B-E 濃度變化以及收集端之 A-B-E 濃度變化趨勢圖

表 4-4 不同滲透蒸發薄膜對 solvents 和 acids flux 和 removal volume 比較

Membrane	Flux (g/m <sup>2</sup> /h)					
	Acetone	Butanol	Ethanol	Acetic acid	Butyric acid	Total
PDMS	0.69	3.91	0.00	1.85	2.65	248.13
PEBA	0.91	9.98	1.72	1.02	2.45	101.75

表 4-5 不同滲透蒸發薄膜對 solvents 和 acids 之 Separation factor 比較

Membrane	Separation factor( $\alpha$ )				
	Acetone	Butanol	Ethanol	Acetic acid	Butyric acid
PDMS	1.63	2.03	0.00	1.11	2.00
PEBA	3.72	9.02	2.31	1.98	2.10

#### 4-3-2 滲透蒸發溫度探討

滲透蒸發操作時，進料溶液之溫度亦會影響其分離效能，隨著溫度提高而通量也會上升。根據文獻指出(Eyring H., 1935)，糾結纏繞繞的高分子鏈因熱運動，在高分子鏈中產生瞬間分子可穿過之孔洞；又根據自由體積理論，隨著溫度上升高分子鏈的震動頻率及振幅增加，導致自由體積變大，使得小分子可以通過，同時也大幅提升大分子可穿透的機會，造成通量上升。

在高溫操作下可以提高滲蒸發效能。然而，由於發酵槽溫度控制在低溫(37 °C)，為了避免大量能源的耗費，因此，溫度影響對於滲透蒸發移除效能選了 37、50 和 60 °C，來探討 PEBA 薄膜對於滲透蒸發移除效能。結果由圖 4-9、4-10 所示，較高的溫度導致了較高的滲透通量獲得，由於高溫可提高蒸發通量，從而導致增加滲透通量。由選擇比(separation factor)顯示，相對於丙酮和乙醇，PEBA 薄膜有較高的丁醇選擇比；但隨著溫度增加而降低了所有溶劑的選擇比，這表示在高溫下有許多非目標物會滲透過 PEBA 薄膜比目標物多，顯示丁醇的敏感性對溫度更顯著高於丙酮和乙醇，這項發現也與文獻(F.F. Liu et al.,2005)有相同的結果。在丁醇移除通量上並未隨著溫度的提升而有顯著地增加，為了避免多於能源耗費在冷卻回流發酵槽的發酵液，故選定與發酵溫度一致的 37 °C 作為滲透蒸發操作溫度。

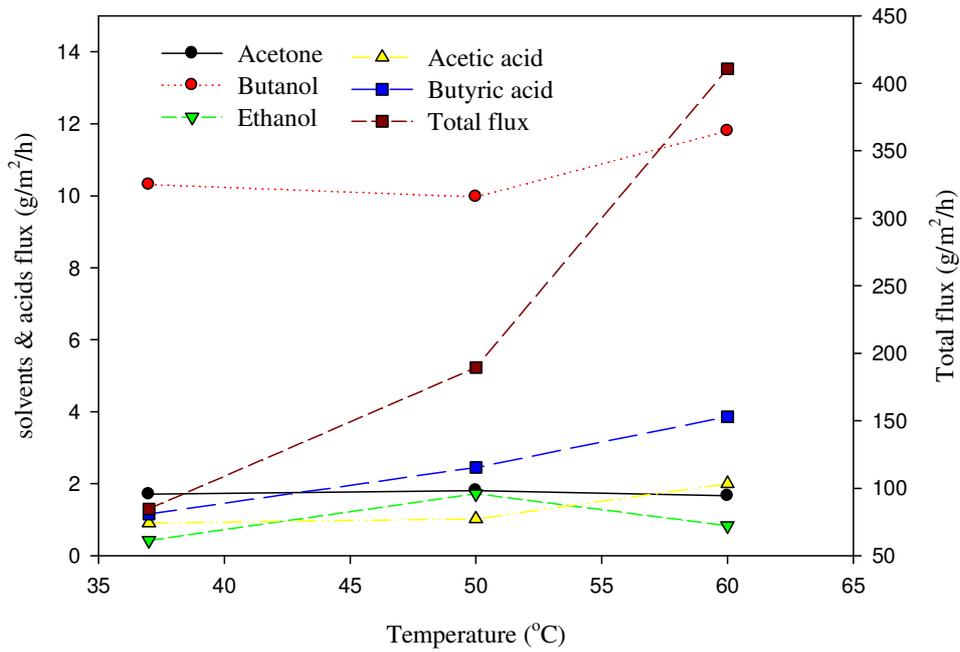


圖 4-9 不同滲透蒸發操作溫度(37、50、60 °C)對滲透蒸發端產物移除通量變化情形

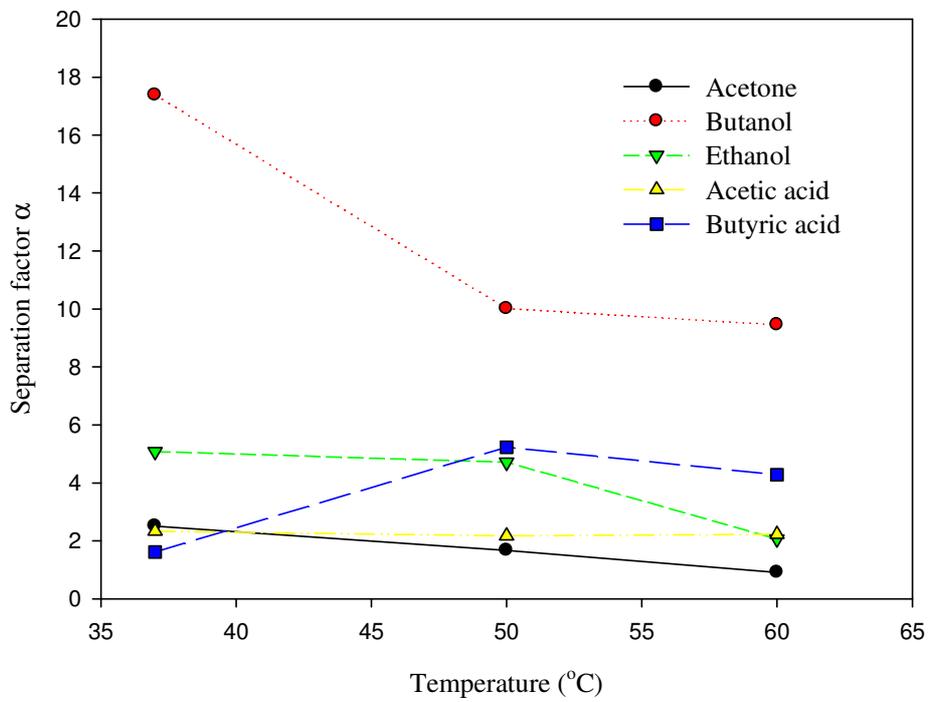


圖 4-10 不同滲透蒸發操作溫度(37、50、60 °C)對滲透蒸發端產物選擇比變化情形

### 4-3-3 滲透蒸發系統之質量平衡探討

由於滲透蒸發系統並不是一完全密閉的系統，因為操作滲透蒸發系統時，槽內物質可能散失至外部環境中，因此設計實驗探討在操作溫度 37 °C 運作滲透蒸發系統時各個物質之質量平衡，同時也作為接下來串連發酵槽實驗產物之依據。從槽內之移除量與滲透蒸發端之收集量做比較，其結果如下表 4-6，丙酮和乙醇之質量平衡分別只有達到 30.8 以及 21.0%，而丁醇之質量平衡則有 71.4%，可能是由於丙酮以及乙醇擁有較高的蒸氣壓，易散失至外部環境中而導致收集量大幅減少；另一項可能原因是來自於真空馬達吸力太強，導致收集物質尚未冷凝至收集瓶就被抽走，而大幅降低了回收率。藉由實驗結果，未來可應用在發酵槽中溶劑總產量的推算。

表 4-6 A-B-E 在滲透蒸發系統之質量平衡

Recovery(g) / Removed (g)			Mass Balance (wt %)		
Acetone	Butanol	Ethanol	Acetone	Butanol	Ethanol
0.298 / 0.966	1.295 / 1.813	0.065 / 0.307	30.8	71.4	21.0

#### 4-3-4 不同丁醇濃度發酵程序進行滲透蒸發系統移除

丁醇是為我們最終想要的產物，但高濃度的丁醇會毒害的菌體，導致菌體死亡，如何選擇較佳時機進行滲透蒸發分離程序是一個值得我們探討的議題，本實驗以發酵槽內之丁醇濃度為指標，分別在發酵槽內丁醇濃度達到  $4 \pm 1$ 、 $7 \pm 1$  和  $10 \pm 1$  g/L，串連滲透蒸發系統進行移除程序。滲透蒸發歷時 8 小時在三種不同丁醇濃度，在此之後，ABE 發酵保持下去直到結束，總發酵時間為 60 小時。實驗結果如圖 4-12、13、14 所示，由葡萄糖消耗來看，有串聯滲透蒸發系統發酵把初始 200 g 葡萄糖全部消耗完，而傳統批次只消耗 187 g 葡萄糖，由葡萄糖消耗的增加意味著透過滲透蒸發移除發酵槽中溶劑，緩解了丁醇對於菌體的毒害並加強碳源利用，利於丁醇的生產。另外值得一提的是傳統批次發酵和結合滲透蒸發之批次發酵對於菌體的生長影響，由圖 4-11 所示，傳統批次發酵的菌體量在 24 hr 後會快速的下降，主要是因為丁醇開始大量在發酵液中累積，在  $4 \pm 1$ 、 $7 \pm 1$  丁醇濃度結合滲透蒸發之批次發酵，菌體平均維持在一定水平範圍內，而在  $10 \pm 1$  g/L 丁醇濃度結合滲透蒸發之批次發酵，菌體已經有明顯地下降，顯然在丁醇濃度在在  $10 \pm 1$  g/L 開始進行滲透蒸發已經太晚了，因為丁醇已累積到抑制濃度約為 10-15 g /L，此時已經嚴重影響到菌體的生長代謝，並導致了菌體量快速下降。最後生長動力參數如表 4-7 所示，最大丁醇生產速率(productivity)和產率(yield)在  $4 \pm 1$  丁醇濃度結合滲透蒸發之批次發酵分別為 0.277 g/l/h 和 207 g/g，相較於傳統批次發酵的 0.194 g/h/l 和 0.155 g/g 分別提高約 43% 和 34%。除此之外還改善菌體量維持在一定的範圍且增加葡萄糖的消耗，這樣說明了滲透蒸發系統能成功地應用在 ABE 發酵中。

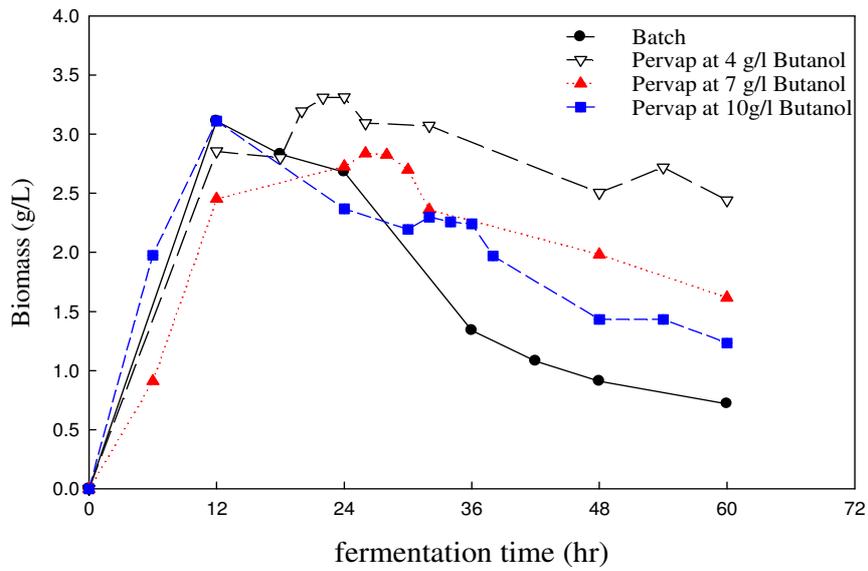


圖 4-11 不同丁醇發酵濃度進行滲透蒸發與批次發酵對於 Biomass 生長情形比較

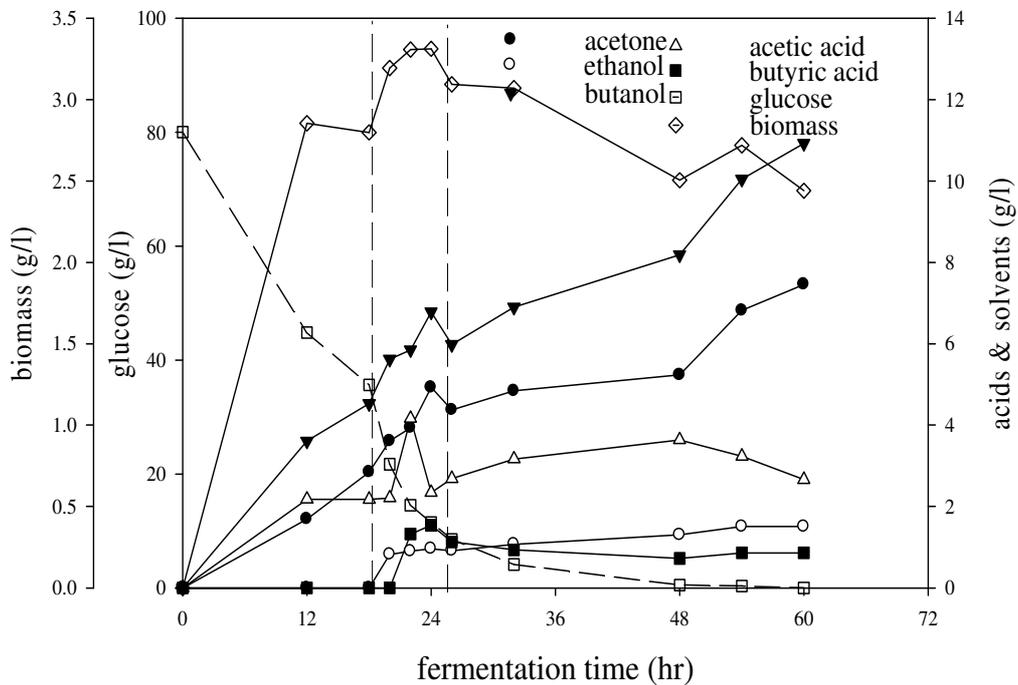


圖 4-12 發酵槽在丁醇濃度=4±1 g/L 時，串聯滲透蒸發系統進行批次發酵生產 ABE 之情形 (黑色虛線區間為 8 小時滲透蒸發操作)

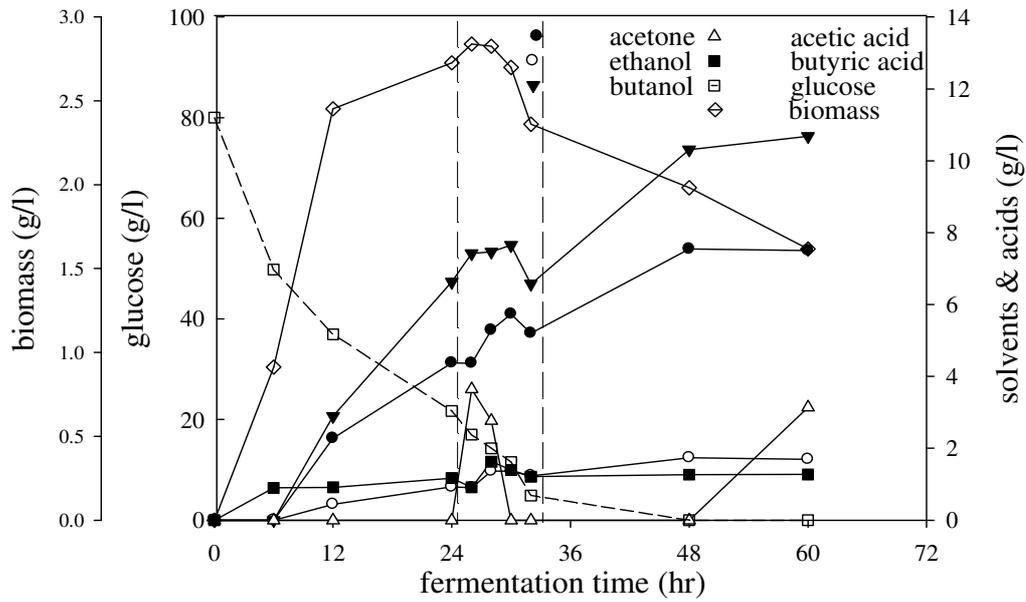


圖 4- 13 5 L 發酵槽在丁醇濃度=7±1 g/L 時，串聯滲透蒸發系統進行批次發酵生產 ABE 之情形 (黑色虛線區間為 8 小時滲透蒸發操作)

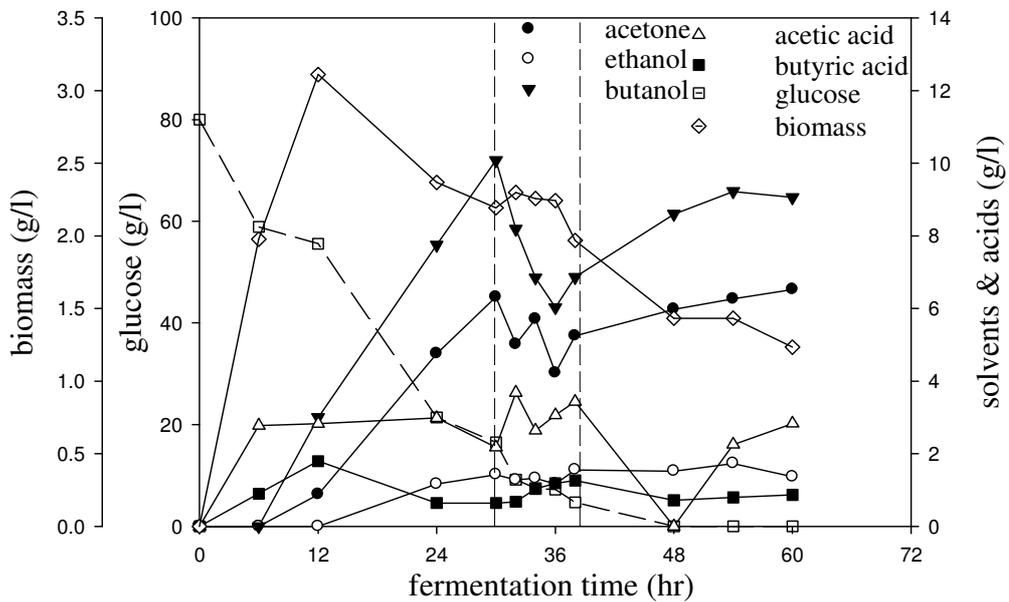


圖 4- 14 5 L 發酵槽在丁醇濃度=10±1 g/L 時，串聯滲透蒸發系統進行批次發酵生產 ABE 之情形 (黑色虛線區間為 8 小時滲透蒸發操作)

表 4-7 不同丁醇發酵濃度進行滲透蒸發與傳統批次發酵對於 Butanol produced、Butanol productivity&Yield 及 Glucose utilization 比較

Butanol of pervaporation initialized (g/l)	Butanol <sup>1</sup> (g)	Glucose utilization (g)	Butanol productivity (g /l/h)	Butanol Yield <sup>2</sup> (g/g.)
Batch	29.0	187	0.194	0.263
4±1 batch	37.8	200	0.252	0.322
7±1 batch	41.5	200	0.277	0.342
10±1 batch	35.5	200	0.237	0.281

<sup>1</sup> the sum of butanol produced in the fermenter and collected in the permeate

<sup>2</sup>yield is defined as butanol produced per glucose consumed



圖 4-15 發酵過濾液及滲透蒸發回收液展示圖

由左至右分別為:原始發酵液、陶瓷過濾模組過濾後之澄清發酵液、滲透蒸發系統回收之產物。



圖 4-16 應用陶瓷過濾模組以及滲透蒸發系統於 5-L 發酵槽之操作情形

#### 4-3-5 結合滲透蒸發與葡萄糖饋料應用於 ABE 發酵

根據前面不同丁醇之發酵濃度發酵槽串連滲透蒸發系統，對移除發酵液中丁醇之探討。選擇了丁醇發酵濃度在  $7\pm 1$  g/L 有較佳丁醇生產速率及產率，分別為 0.277 g/l/h 和 0.207 g/g，為了進一步改善丁醇生產速率，本實驗將葡萄糖饋料與滲透蒸發系統結合，在開始饋料的同時開始進行滲透蒸發的操作，從 24hr 到 48 小時總共歷時 24 hr，饋料濃度 50 (w/v) %、饋料流速為 15 ml/ hr 進行饋料，饋料時間與操作滲透蒸發時間一致，因此饋料體積與滲透蒸發移除體積大致相同，所以在此實驗並無稀釋效應(dilute effect)。結果如圖 4-17 所示，在滲透蒸發操作期間丁醇濃度維持在 6-8 g/L，這是低於丁醇抑制濃度 10-15 g/L，由於滲透蒸發移除溶劑使得發酵槽內維持低丁醇濃度，這有助於菌體的生長並增加碳源之利用。不過，在滲透蒸發後期丙酮、丁醇和乙醇濃度在發酵槽內略有增加趨勢，這意味著丁醇的移除速率還是低於 *C. acetobutylicum* 的丁醇生產速率。未來可以藉由增加薄膜面積來改善。綜合上述葡萄糖饋料實驗之生長動力學參數如表 4-10，這說明了葡萄糖饋料同時進行滲透蒸發操作可以有效提高丁醇生產速率，其丁醇生產速率和產率分別為 0.270 g/l/h 和 0.169 g/g，這顯示透過滲透蒸發系統移除溶劑可避免丁醇大量累積積至發酵槽內，進一步在提高丁醇生產速率和產率。由此說明應用滲透蒸發系統和葡萄糖饋料在 ABE 發酵中生產丁醇具有相當不錯的潛力與可行性。

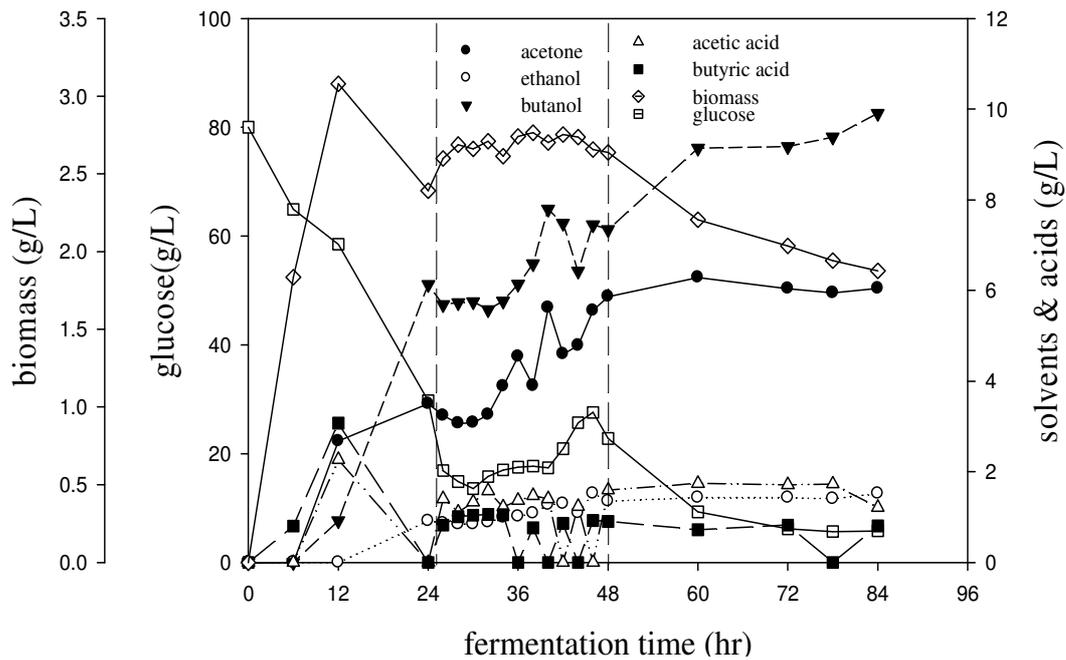


圖 4- 17 5-L 發酵槽串聯滲透蒸發與葡萄糖饋料生產 ABE 之情形  
(黑色虛線區間為 24 小時滲透蒸發操作)

表 4- 8 不同丁醇發酵濃度進行滲透蒸發之 solvents 和 acids flux 比較

Butanol of pervaporation initialized (g/l)	Average solvents & acids permeat flux (g/m <sup>2</sup> /h)					
	Acetone	Butanol	Ethanol	Acetic acid	Butyric acid	total
4±1 batch	3.19	9.94	0.56	0.00	0.08	236.62
7±1 batch	3.40	15.18	0.71	0.00	0.22	195.38
10±1 batch	0.48	12.15	0.28	0.05	0.25	160.80
Glucose feeding	2.65	14.18	0.50	0.00	0.52	177.51

表 4- 9 不同丁醇發酵濃度進行滲透蒸發之 solvents 和 acids Separation factor 比較

Butanol of	Separation factor $\alpha$

pervaporation initialized (g/l)	Acetone	Butanol	Ethanol	Acetic acid	Butyric acid
4±1	4.21	8.64	3.35	0.00	0.27
7±1	4.29	14.19	3.30	0.00	0.31
10±1	0.75	13.68	1.65	0.14	2.13
Glucose feeding	3.91	14.96	3.07	0.00	2.27

表 4- 10 葡萄糖饋料進行滲透蒸發與傳統批次發酵對於 Butanol produced、Butanol productivity&Yield 及 Glucose utilization 比較

Fermentation strategy	Butanol <sup>1</sup> (g)	Glucose utilization (g)	Butanol productivity (g/l/h)	Butanol Yield <sup>2</sup> (g/g)
Batch	29.0	187	0.194	0.155
Glucose feeding	56.5	336	0.270	0.169

<sup>1</sup>the sum of butanol produced in the fermenter and collected in the permeate

<sup>2</sup>yield is defined as butanol produced per glucose consumed

表 4- 11 文獻上利用滲透蒸發應用在 ABE 發酵對 solvents productivity & yield 比較

Process	Membrane	Solvents productivity (g/l/h)	Solvents yield (g/g)	ref.
---------	----------	-------------------------------------	-------------------------	------

fed-batch	silicone membrane	0.98	0.43	N. Qureshi,2000
fed-batch	Silicalite–silicone composite membrane	0.18	0.31	N. Qureshi,2001
continuous	silicone membrane	3.50	0.39	N. Qureshi et al.,2004
continuous	ionic liquid membrane	2.34	-	Katrin Schwarz at al.,2008
Glucose feeding	PEBA	1.08	0.39	this work

#### 4-3-6 總結

滲透蒸發分離技術可以有效地從水溶液中將有機物質移除，且具有較低的能源耗費已被許多文獻證實具有相當大的發展潛力。由本實驗中得到 PEBA 薄膜相較於 PDMS 薄膜有較佳丁醇移除通量及選擇比。在滲透蒸發應用在 ABE 發酵時機選擇，由滲透蒸發動力參數如表 4-8、4-9 所示，在  $7 \pm 1$  丁醇濃度有較佳丁醇移除通量以及選擇比，故在  $7 \pm 1$  丁醇濃度開始進行滲透蒸發為最佳。而在葡萄糖饋料與滲透蒸發系統結合實驗中，不斷移除發酵槽內溶劑以及提供碳源也能有效提高丁醇生產速率和產率。

在表 4-11 為文獻以滲透蒸發結合 ABE 發酵與本研究結果比較，由比較結果得知，以文獻中連續式饋料有較高的 ABE 生產速率，由於本研究在結合滲透蒸發與饋料應用於 ABE 發酵的時間較短，導致 ABE 生產速率低於文獻之結果。因此若要將 ABE 生產速率提高，未來可應用長時間的操作配合連續式饋料以及改變饋料濃度來提升其生產速率。在滲透蒸發系統方面，可藉由改良其薄膜對產物之選擇比，以及提高其薄膜有效接觸面積來增加丁醇移除通量，降低丁醇在發酵槽內之濃度。從應用的角度來看，以長時間連續進行 ABE 發酵並結合滲透蒸發分離技術具有很大的潛力應用在工業上。

## 第五章 結論與建議

### 5-1 結論

1. 在吸附劑材料的選擇方面，由於活性碳對丁醇有較強的吸附效果為 0.042 g / g AC，故選顆粒狀活性碳為吸附實驗中之吸附劑。
2. 活性碳對於應用在吸附 ABE 發酵中之丁醇並不太理想，未來可改用對丁醇有專一性吸附性且對菌體無毒害之吸附劑當作材料，來探討其吸附效果對 *C. acetobutylicum* 生產丁醇之影響。
3. 在滲透蒸發膜材的選擇方面，由於 PEBA 對丁醇有較高選擇比，故選為實驗中之滲透蒸發膜材。
4. 在滲透蒸發操作溫度影響方面，37、50 和 60°C 之丁醇移除通量分別為 10.31、9.97 和 11.8 g/m<sup>2</sup>/h，其隨著操作溫度提高並未能明顯提升丁醇移除量，且對丁醇選擇比也相對變低，故選擇 37 °C 為實驗中之滲透蒸發操作溫度。
5. 不同丁醇濃度進行滲透蒸發系統移除程序之批次發酵實驗中，顯示在丁醇濃度在 7±1 g/L 進行滲透蒸發移除程序，其丁醇生產速率及產率分別為 0.277 g /l/h 和 0.207 g /g 為最佳，相對於無串聯滲透蒸發系統之傳統批次操作其丁醇生產速率及產率相對提升了 43% 和 34 %。
6. 在結合滲透蒸發與葡萄糖饋料對 *C. acetobutylicum* 生產丁醇的影響，其丁醇生產速率及產率分別為 0.270 g/ l/ h 和 0.169 g/g，顯示未來以長時間連續式饋料具有相當不錯的潛力與可行性。

## 5-2 未來展望

未來如果將 PEBA 滲透蒸發薄膜結合 ABE 發酵應用在工業界上，首要考量的第一因素為成本，如何降低成本、增加利潤，是企業界最關心的問題。本研究是利用葡萄糖當作碳源，並不適合利用於工業上的應用，未來可以尋找替代性原料，例如使用農業廢棄物 (waste) 與木質纖維 (lignocellulose) 來取代農業糧食，如玉米、番薯澱粉等，避免發酵程序發生與民爭食之隱憂。在菌種方面，可以利用基因改殖或突變方式進行菌種改良，找出具備高溶劑產量、高生產速率與丁醇毒化耐受性高之菌種，以提升商業化潛力。本研究中發現 PEBA 薄膜在經過數次操作後，其薄膜表面經由 SEM 測試出現龜裂的現象，表示薄膜的機械強度並不太理想，在短時間操作後需更換，對於應用於工業上不符合成本，未來可藉由薄膜改質以提升薄膜結構強度。在應用 PEBA 滲透蒸發膜與葡萄糖控制在 5L 發酵槽實驗結果顯示，不斷移除丁醇對 ABE 發酵能有效提高丁醇生產速率和產率，從應用的角度來看，長時間連續 ABE 發酵結合與滲透蒸發技術具有很大的潛應用在工業上。

## 参考文献

- Bahl HW, and Gottschalk G,Andersch. (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.
- Blaschek HP, Annous BA. (1991) Isolation and Characterization of *Clostridium acetobutylicum* Mutants with Enhanced Amylolytic Activity.*Applied and Environmental Microbiology*, 57: 2544-2548.
- Bahl HW, Braun K, Gottschalk G, Andersch. (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.
- Baker RW, Wijmans JG. (1993). A simple predictive treatment of the permeation process in pervaporation. *Journal of Membrane Science*, 79 :101-113.
- Bochman MF, Murillo CA, Wilkinson G, Cotton.(1999). Advanced inorganic chemistry. USA : *John Wiley and Sons, Inc.*
- Böddeker KW, Bengtson, Bode GE. (1990). Pervaporation of low volatility aromatics from water. *Journal of Membrane Science*, 53:143–158.
- Böddeker KW, Bengtson, Pingel GH. (1990). Pervaporation of isomeric butanols. *Journal of Membrane Science*, 54:1-12.
- Chen C-K, Blaschek HP. (1999). Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium beijerinckii*BA101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 170-173.
- Dolly Montoya, Sandra Silva , Wolfgang H, Schwarz. (2000). Isolation of

- mesophilic solvent-producing clostridia from Colombian sources: physiological characterization, solvent production and polysaccharide hydrolysis. *Journal of Biotechnology*, 79: 117-126.
- Durre P. (2007). Biobutanol : An attractive biofuel. *Biotechnol Journal*, 2:25-1534.
- El-Zanati E, Abdel-Hakim E, Fahmy M. (2006). Modeling and simulation of butanol separation from aqueous solutions using pervaporation. *Journal of Membrane Science*, 80:278-283.
- Ezeji TN, Blaschek HP. (2008). Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia. *Bioresource Technology*, 99:232-242.
- Ezeji TN, Blaschek HP, Qureshi N. (2007). Butanol Production From Agricultural Residues: Impact of Degradation Products on *Clostridium beijerinckii* Growth and Butanol Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 97:1460-1469.
- Falbe J. (1970). Carbon monoxide in organic synthesis. *Berlin-Heidelberg-New York : Springer Verlag*.
- Fouad EA, Feng X. (2008) Use of pervaporation to separate butanol from dilute aqueous solutions: Effects of operating conditions and concentration polarization. *Journal of Membrane Science*, 323: 428–435
- Friedl AN, Maddox IS, Qureshi N. (1991). Continuous acetone-butanol-ethanol fermentation using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* in a packed bed reactor and integration with product removal by pervaporation. *Biotechnology and Bioengineering*, 38:18–527.
- Gryta M. (2002). The assessment of microorganism growth in the membrane distillation system. *Desalination*, 142:79-88.
- Huang YM. (1991). Pervaporation membrane separation process. *Elsevier Science Publishers B.V*.

- Huang YM, Shieh JJ. (1997). Pervaporation with chitosan membranes II. Blend membranes of chitosan and polyacrylic acid and comparison of homogeneous and composite membrane based on polyelectrolyte complexes of chitosan and polyacrylic acid for separation of ethanol-water mixtures. *Journal of Membrane Science*, 127:185-202.
- Huang J. (2001). Pervaporative recovery of n-butanol from aqueous solutions and ABE fermentation broth using thin-film silicalite-filled silicone composite membranes. *Journal of Membrane Science*, 92:231-242.
- Jones DT, Woods DR. (1986). Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews*, 50:484-524.
- Jones DT, Woods. (1986). Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews*, 50: 484-524.
- Lee SY, Jang SH, Nielsen LK, Kim J, Jung KS, Park JH. (2008). Fermentative Butanol Production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, 101:209-228.
- Liu F, Liu L, Feng X. (2005) Separation of acetone–butanol–ethanol (ABE) from dilute aqueous solutions by pervaporation. *Separation and Purification Technology*, 42:273-282.
- Madihah MS, Sahaid KM, Suraini AA, Karim MIA. (2001). Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17:567-576.
- Peter H, Pfromm Amanor-Boadu, Richard Nelson, Praveen Vadlani, Ronald Madl Vincent. (2010). Bio-butanol vs. bio-ethanol: A technical and economic assessment for corn and switchgrass fermented by yeast or *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass and Bioenergy*, 34:515-524.
- Qureshi N, Maddox IS, Cotta MA. (2005). Energy-efficient recovery of

- butanol from model solutions and fermentation broth by adsorption. *Bioprocess Biosystems Engineering.*, 27: 215–222.
- Qureshi N. and Blaschek HP. (2001). Recent advances in ABE fermentation : hyper-butanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27:287-291.
- Qureshi N, Blaschek HP. (2000). Butanol production using *Clostridium beijerinckii* BA101 hyper-butanol producing mutant strain and recovery by pervaporation. *Appl Biochem Biotechnol*, 85:225–235.
- Qureshi N, Friedl A, Maddox IS. (1992). Application of continuous substrate feeding to the ABE fermentation: Relief of product inhibition using extraction, perstraction, stripping, and pervaporation. *Biotechnology Progress.*, 8:382–390.
- Qureshi N, Huang J. (2001). Pervaporative recovery of n-butanol from aqueous solutions and ABE fermentation broth using thin-film silicalite-filled silicone composite membranes . *Journal of Membrane Science*, 192:231-242.
- Qureshi N, Ezeji TC. (2008). Butanol, ‘a superior biofuel’ production from agricultural residues (renewable biomass):Recent progress in technology. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 2:319–330.
- Roffler SR, Wilke CR, Blanch HW. (1984). In situ recovery of fermentation products. *Trends Biotechnol*, 2:129–136.
- Swodenk W. (1983). Ethanol als Rohstoff fur die chemische Industrie. *Chemie Ingenieur Technik*, 55:683-688.
- Sang Yup Lee, Jang JH, Nielsen LK, Kim J, Jung KS. (2008). Fermentative Butanol Production by Clostridia. *Biotechnology Bioengineering.*, 101: 209-228.
- Zhang YY, Yang F, Zhang C. (2009). Continuous acetone-butanol-ethanol production by corn stalk immobilized cells. *Journal of Industrial Microbiology*

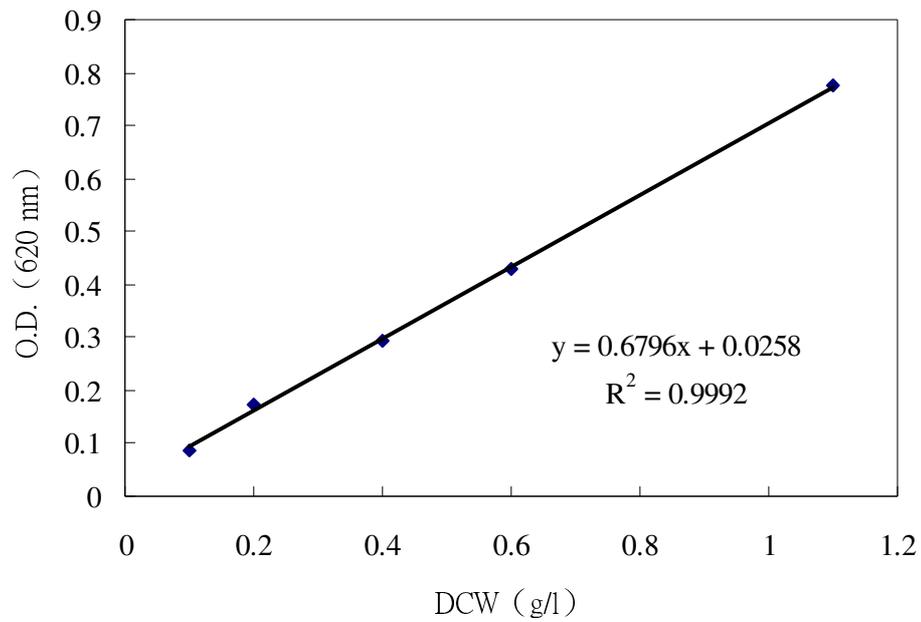
*and Biotechnology* , 36:1117-1121.

周世凱、許梅娟. (2009). 新能源－生物產丁醇. 科學發展, 433:26-31.

顧惕人. (1999). 表面化學. 科學出版社, 234-261.

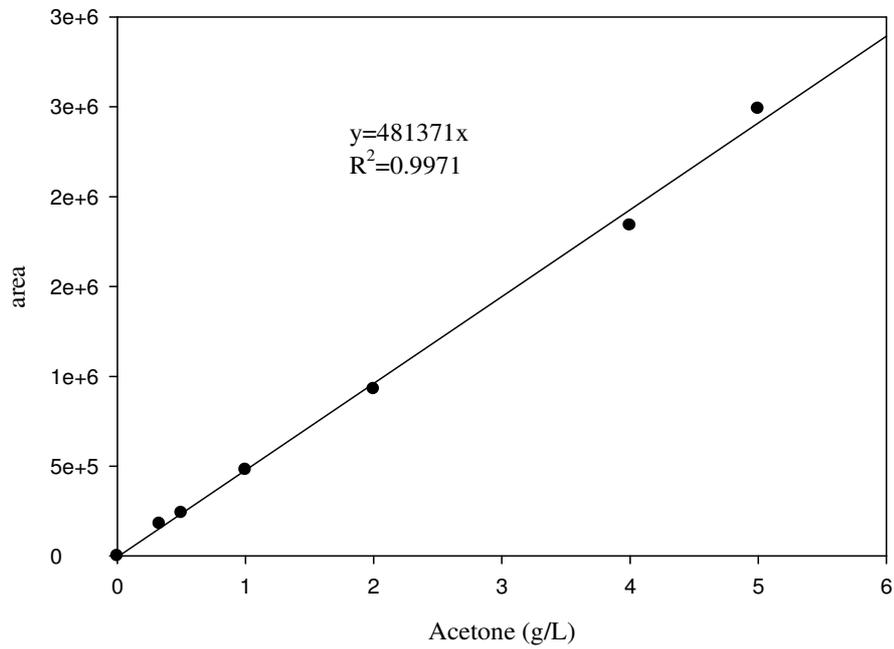
## 附錄

附錄 1:菌體乾重 (biomass) 檢量線



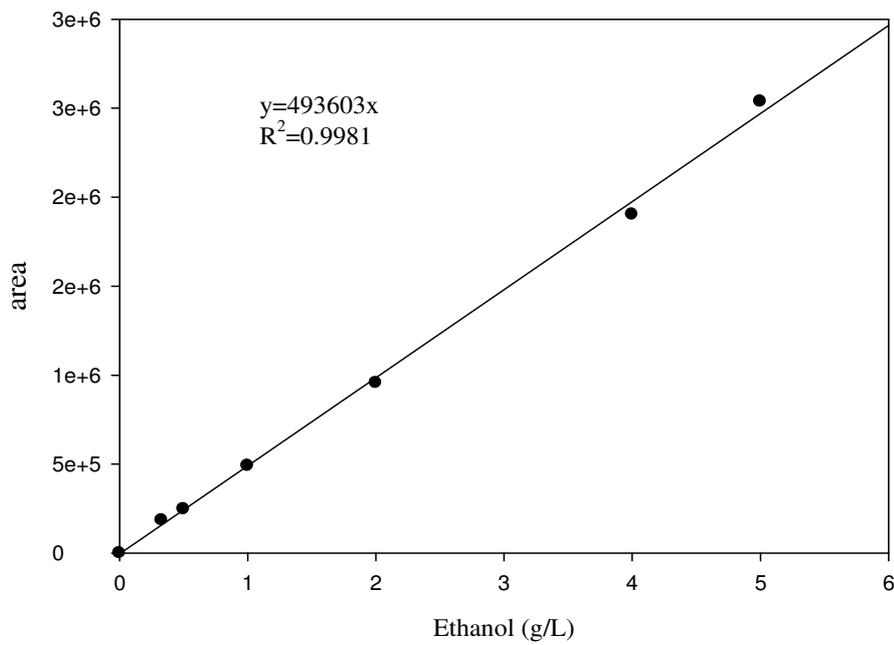
菌體乾重檢量線方程式： $DCW(g/l)=(O.D.-0.0258)/0.6796$

附錄 2:丙酮 (acetone) 檢量線



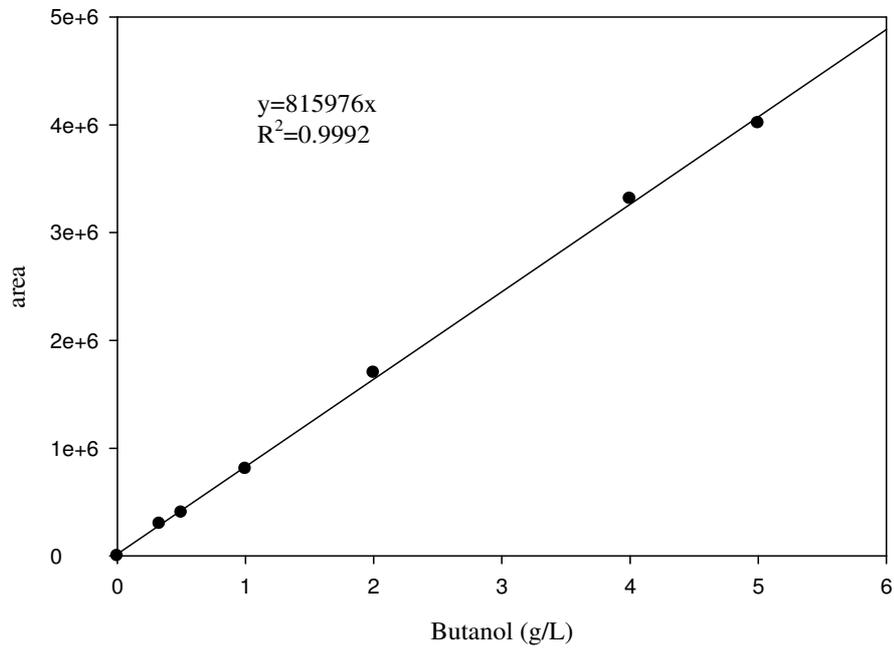
丙酮 (acetone) 檢量線方程式：Concentration(g/l)=area/481371

附錄 3:乙醇 (ethanol) 檢量線



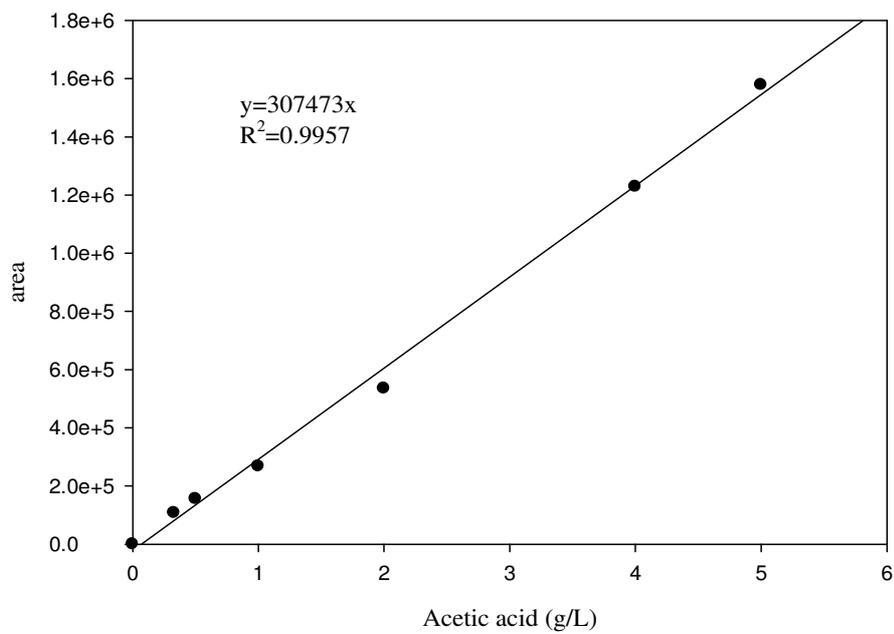
乙醇 (ethanol) 檢量線方程式：Concentration(g/l)=area/493603

附錄 4: 丁醇 (butanol) 檢量線



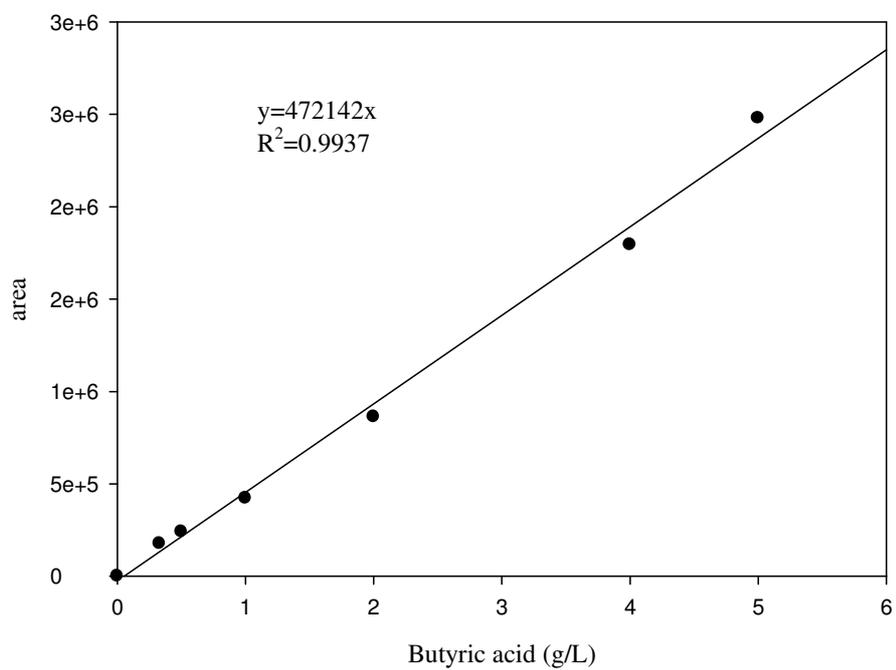
丁醇 (butanol) 檢量線方程式：Concentration(g/l)=area/815976

附錄 5: 乙酸 (acetic acid) 檢量線



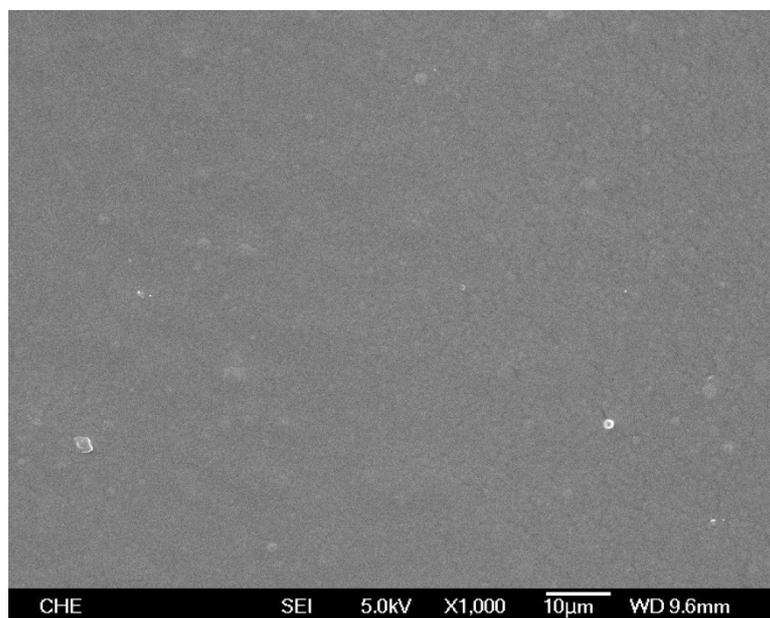
乙酸 (acetic acid) 檢量線方程式：Concentration(g/l)=area/307473

附錄 6: 丁酸 (butyric acid) 檢量線

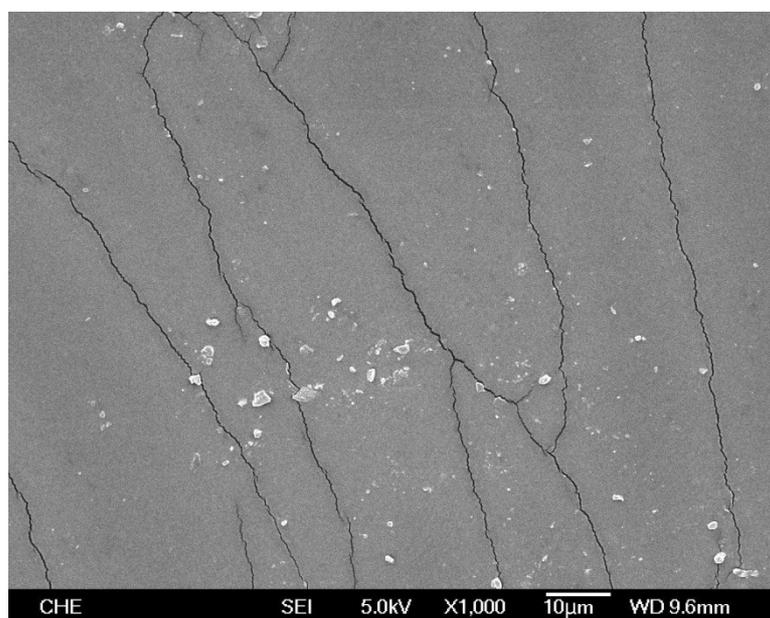


丁酸 (butyric acid) 檢量線方程式：Concentration(g/l)=area/472142

**附錄 7: 滲透蒸發操作前之 PEBA 薄膜之 SEM 圖**



**附錄 8: 滲透蒸發薄膜操作 24 小時後之 PEBA 薄膜之 SEM 圖**



## 簡歷

姓名：林尚甫

籍貫：台灣省台中市潭子區

生日：76年2月13日

學歷：



教育背景	學校	科(系)別	畢業日期
高中	國立大里高中	普通科	民國 94 年 6 月
大學	東海大學	化學工程系	民國 98 年 6 月
研究所	東海大學	化學工程與材料工程研究所	民國 100 年 6 月

經歷：

- 2011 年 生質煉油廠-替代燃料與石化品技術整合研討會 研習
- 2011 年 二十九屆台灣觸媒與反應工程研討會 研習



2010年7/30 實驗室成員於新竹司馬庫斯巨木合影