

公開

密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：010201a212

## 行政院農業委員會九十六年度科技計畫研究報告

- 計畫名稱：**應用多重生物技術轉化稻草與狼尾草成多種生質能源之研發-生質能源嗜熱性厭氧纖維水解菌及產氫菌之篩選與應用 (第1年/全程1年)**
- (英文名稱) **Application of multidisciplinary biotechnology for bioenergy production from rice straw and Napiergrass--Screening and application of thermophilic anaerobic cellulolytic and hydrogen-producing bacteria for bioenergy production**
- 計畫編號：96農科-1.2.1-科-a2(12)
- 全程計畫期間：96年1月1日至96年12月31日
- 本年計畫期間：96年1月1日至96年12月31日
- 計畫主持人：黃啟裕
- 執行機關：私立東海大學
- 合作機關：國立成功大學



960135

## 一、中文摘要：

生質能源由於石化燃料的缺乏在近幾年倍受各國重視，而狼尾草以及稻桿由於富含纖維素成分而具有生質潛力，並被評為適合台灣的可能生質燃料來源之一。本研究藉分離草食動物(牛及馬)糞肥中嗜熱厭氧纖維水解菌株並進行後續纖維水解能力之探討，以期可自自然纖維物質中獲取生質燃料。結果共分離出17株厭氧纖維水解菌，其中Strain TCW1為來自牛糞中之高效纖維水解菌株，在降解研磨成粉之狼尾草及稻桿時可在5天內完全分解，產生之總醣分別可達2.39以及1.75 g/L，顯示strain TCW1的確具水解自然纖維基質之能力。此外本研究亦自牛糞中分離一株嗜熱性產氫菌*Clostridium* sp，可利用單、雙糖醱酵產氫，氫氣產率達1.3 mol H<sub>2</sub>/mol glucose及1.0 mol H<sub>2</sub>/mol sucrose。本研究合作團隊成功大學化工系亦自一高效率產氫泥漿式反應器中分離出篩選純化出6株*Clostridium butyricum* (strain CGS 1-6)，2株*Clostridium pasteurianum* (strain CH1 and CH6)，及1株*Klebsiella* sp，共9株醱酵產氫菌，其中*C. butyricum* (strain CGS5)氫氣產率達2.78 mol H<sub>2</sub>/mol sucrose，為目前全球已知最高產氫效率。這些產氫菌均可利用纖維水解菌strain TCW1之纖維水解液進行產氫醱酵。其中效率最高之*C. butyricum* CGS5產氫率為> 2 mmol H<sub>2</sub>/g reducing sugar (以alpha-纖維素水解液為基質)，< 2 mmol H<sub>2</sub>/g reducing sugar (以狼尾草水解液為基質)。

## 二、英文摘要：

Bioenergy has gained much attention worldwide because of fossil fuel depletion. Due to their abundance of cellulosic material, rice straw and Napiergrass have been considered as great bioenergy crops in Taiwan since bioenergy can be produced from cellulose bioconversion. Hydrogen is the cleanest energy during its combustion among all bioenergy and has regained attention in the last decade. The work of this study was to isolate thermophilic anaerobic cellulolytic bacteria from herbivorous animals (cattle and horse) manure and investigate the cellulolytic capability of the isolates in order to assess biohydrogen production potential from nature cellulosic materials. 17 thermophilic cellulolytic anaerobes are isolated from these animal manure in this study. One of the isolates, *Clostridium thermosaccharolyticum* strain TCW1 isolated from cow manure possesses the highest cellulolytic capability among all isolates, it can hydrolyze Napiergrass and rice straw powder completely in 5 days and 2.39 and 1.75g/L of total sugar are produced respectively. The results show that strain TCW1 can hydrolysis nature cellulosic materials. A thermophilic non-cellulolytic H<sub>2</sub>-producing *Clostridium* is also isolated from cow manure. It can utilize mono- and disaccharides for biohydrogenation, the hydrogen yield is 1.3 mol H<sub>2</sub>/mol glucose and 1.0 mol H<sub>2</sub>/mol sucrose. The cooperated team of Chemical engineering department in Natinal Cheng-Kung university also isolates 9 strains of H<sub>2</sub>-producing bacteria [6 strains of *Clostridium butyricum* (strain CGS 1~6), 2 strains of *Clostridium pasteurianum* (strain CH1 and CH6) and 1 strain of *Klebsiella* sp] from a carrier-induced granular sludge bioreactor. The H<sub>2</sub> yield of *C. butyricum* can reach 2.78 mol H<sub>2</sub>/mol sucrose which is the highest H<sub>2</sub> production yield currently known in the world. All these isolated H<sub>2</sub>-producing bacteria are found to be able to produce H<sub>2</sub> from the cellulose hydrolysate of strain TCW1. The H<sub>2</sub> production yield of *C. butyricum* CGS5 is greater than 2 mmol H<sub>2</sub>/g reducing sugar (alpha-cellulose as cellulosic substrate) and lower than 2 mmol H<sub>2</sub>/g reducing sugar (Napier grass as cellulosic substrate).

### 三、計畫目的：

在台灣稻草廢棄物屬農業廢棄物之大宗，每年產生約235萬公噸，而牧草-狼尾草年產量為每公頃達60公噸，此二者均為可再回收資源化之農業廢棄物。稻草及狼尾草非常適合微生物分解。使用生物降解方式處理如此大量的農業廢棄物，不止達成廢棄物減量、再利用，更能開發替代能源。

本子計畫之主要研究方向為篩選純化嗜熱性厭氧纖維素分解與氫氣生成菌株，以獲得純種菌株，了解分離菌株之生長特性及功能，以提供其他研究團隊對分離菌株之纖維水解及產氫酵素做功能性探討，篩選效率高的纖維素水解酶及產氫酶

，進一步以蛋白質工程方式加以強化，以利未來進行利用基因改造之稻米及狼尾草等作物回收生質酒精及生質氫氣、生質甲烷之研究。因此本計畫主要目標有四項：

1. 由高效能厭氧纖維素分解反應槽分離高效能厭氧纖維素分解菌株。
2. 由高效能產氫污泥分離篩選優質高效能厭氧產氫菌株。
3. 完成分離菌株之菌種鑑定。
4. 解明高效能厭氧纖維素分解菌及產氫菌之解纖/產氫特性。

#### 四、重要工作項目及實施方法：

##### 工作項目

1. 首先建立批次嗜熱厭氧式纖維素醱酵槽及產氫槽,並以纖維素水解產生生質能或水解產物產氫為主要目標。
2. 以Hungate厭氧技術配合高溫培養箱針對纖維水解及產氫菌群培養及篩選。
3. 利用分子生物技術如16S rRNA gene進行純化之菌種鑑定,建立不同來源之嗜熱性厭氧纖維素水解菌及產氫菌之菌種資料庫。
4. 以氣相層析儀或分光光度計等分析儀器進行纖維水解菌和產氫菌之產能活性分析。

##### 實施方法

###### 1. 厭氧培養基成分

厭氧解纖維菌TA培養基(TA medium)以Hungate氏方法在厭氧操作下進行配製並於分裝後以滅菌釜進行滅菌程序。TA medium之成分如下 (per liter): cellulose, 5 g (carbon source); Trace element solution, 10.0 ml; Vitamin solution, 10 ml; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.40 g; Resazurin, 0.0005 g; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.05 g; MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.10 g; (NH<sub>4</sub>)Cl, 1.00 g; L-Cysteine, 0.50 g; NaHCO<sub>3</sub>, 3.90 g; Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O, 0.25 g (植菌前加入)。Trace element solution其成分為每公升去離子水中含有 conc. HCl 1.0 mL、NiCl<sub>2</sub> 0.05 g、EDTA 0.50 g、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.05 g、FeCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 2.00 g、CuCl<sub>2</sub> 0.03 g、ZnCl<sub>2</sub> 0.05 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.05 g、MnCl<sub>2</sub> 0.05 g、CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.05 g、AlCl<sub>3</sub> 0.05 g、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.10 g。Vitamin solution成分為每公升去離子水中含有 Biotin, 2.0 mg; Thiamine-HCl, 5.0 mg; Pyridoxine-HCl, 10.0 mg; Nicotinic acid, 5.0 mg; Riboflavin, 5.0 mg; Vitamin B<sub>12</sub>, 0.1 mg; DL-Ca-pantothenate, 5.0 mg; Lipoic acid, 5.0 mg; *p*-Aminobenzoic acid, 5.0 mg; Folic acid, 2.0 mg。厭氧產氫菌培養所使用之營養基質(Endo medium)配方如下(per liter): 碳源採用蔗糖 Sucrose, 15g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g; NaCl, 2g; MgSO<sub>4</sub>, 0.1g; Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O, 0.5g。碳源採用蔗, 利用此基質配方來馴養產氫純菌, 使之活化, 並確定它具有產氫能力。之後則直接利用纖維素水解液做為產氫之基質。

###### 2. 微生物生長測定

因培養機中之cellulose為固體物, 因此微生物之生長不能以傳統測量吸光度Optical Density測定。因此擬以總蛋白質量或直接計數作為微生物生長之依據。蛋白質為構成細胞的主要成分, 因此細胞的多寡可利用蛋白質來測量, 可應用於分析細胞於不可溶基質之培養基中微生物生長之情況。本實驗計畫以市售蛋白質分析套件進行分析, 此方法原理為Coomassie Brilliant Blue G-250會與蛋白質結合的特性, 在G-250與蛋白質結合後, G-250的顏色會從紅色轉變成為藍色, 此時在595 nm波長下會有較高的吸收以便偵測。以牛血清蛋白作為標準曲線, 即可推算出樣品中蛋白質的濃度。

###### 3. 纖維素水解醱酵糖之測定

因纖維素為多糖類, 經微生物酵素水解後產生可醱酵糖, 可經測定還原糖類濃度來代表纖維素轉化氫氣之潛能。還原醣濃度測定最主要是利用DNS法(Miller, 1959)。其反應原理為含有醛基(CHO)的糖類(如葡萄糖)具有還原力, 能將呈黃色之3,5-二硝基-

水楊酸 (3,5-dinitrosalicylic acid) 還原成紅棕色之3-氨基-5-硝基-水楊酸 (3-amino-5-nitrosalicylic acid)。海藻水解所產生的半乳糖含有醛基，故含有還原力，DNS中的3,5-二硝基-水楊酸會與還原糖引起呈色反應，利用分光光度計將能判斷還原糖的多寡。本研究中以酚-硫酸法(phenol-sulfuric acid)測定樣品中之總糖濃度，將樣品離心後取其上層液並稀釋到適當之濃度，加入5% 酚及硫酸，並靜置一小時，待樣品冷卻後，以分光光度計在波長490 nm測其吸光值，最後將所得之值帶入檢量線求其含糖量(Dubois et al., 1956)。

#### 4. 分離菌株分子生物鑑定

利用細菌16S rRNA基因序列與Genbank進行比對，由分子遺傳層面鑑定菌株之種類。

#### 5. 儀器分析

##### 5.1 醱酵液相成分分析

液相成份部份以SHIMADZU GC-14B Gas Chromatograph with flame ionization detector (FID)，管柱為DB-WAX毛細管柱(30m × 0.319mm × 0.50 μm)，以Ar為載流氣體，注入樣品體積為0.1 μL，偵測乙醇以及醋酸等液相代謝產物，管柱起始溫度為120°C，維持0.5分鐘，隨後以每分鐘20 °C升溫至200 °C，維持2分鐘，注射口溫度設定為230 °C，偵測器溫度設定為210 °C。

##### 5.2 氫氣濃度分析

氣相氫氣濃度以SHIMADZU GC-14B Gas Chromatograph with thermal conductivity detector (TCD)，管柱為玻璃管柱(長度2.1 m，內徑3.2 mm)，填充物為Molecular Sieve 5A 60/80 mesh，以Ar為載流氣體，注入之樣本體積為0.2 mL，流速25 mL/min，條件設定injection temperature 120°C、TCD temperature 140 °C、管柱溫度50 °C。

## 五、結果與討論：

### 1. 草食性動物腸道菌群纖維水解能力

研究由東海牧場牛糞、鹿糞及東海大學附近馬術訓練中心之馬糞混菌群中所培養出來三種嗜熱厭氧混菌菌群。此三種混菌菌群以基質  $\alpha$ -cellulose 5 g/L 培養在絕對厭氧培養基中，培養溫度為 55°C，在實驗前以同樣條件先做增富培養，當菌株達到對數生長期時，再植入實驗培養基中進行批次實驗。

糞混菌群培養基之瓶頂空間充以氮氣，其生長情況會達到最佳，則馬糞和鹿糞混菌群培養基之瓶頂空間皆充以混合氣(80% N<sub>2</sub> + 20% CO<sub>2</sub>)，此兩種混菌群在微酸的環境中生長情況會較佳。在整個實驗過程中，並無調控其PH值。此三種微生物菌群在水解纖維素過程中之生長情形如圖1。纖維素水解過程中纖維素含量變化如圖2。依據圖2，我們也大概地估算了一下這三種厭氧混菌菌群每天所能降解的纖維素量，結果如圖3，牛糞混菌菌群大約每天能夠降解約0.986 g/L 的纖維素，馬糞混菌菌群大約每天能夠降解約1.79 g/L 的纖維素，鹿糞混菌菌群大約每天能夠降解約1.013 g/L 的纖維素，由此結果可得馬糞混菌群中有纖維水解能力較佳的菌種。

在纖維素等多醣類物質解過程中，液相中之總糖濃度代表纖維素被微生物水解酵素分解之程度，三種嗜熱厭氧混菌菌群在纖維素水解過程中總糖產生量，其結果如圖4，發現在培養起始點，液相中含有較高濃度之總糖濃度(約190~210 mg/L)，為纖維素經autoclave過程中所水解釋放之糖類，在經培養1~2天後總糖濃度快速下降，其後漸上升或持平，配合纖維素濃度之變化，可看出初期之糖類很快被微生物所利用，之後隨纖維素之水解釋放糖類培養液中。還原糖含量則是用以評估纖維水解後產生質能(乙醇或氫氣)潛力知依據，還原糖測定則是以光學密度測定法測定，其最主要是利用DNS試劑，含有醛基的糖類具有還原能力，能將3,5-二硝基-水楊酸還原成3-氨基-5-硝基-水楊酸，其是利用DNS試劑中的3,5-二硝基-水楊酸與還原糖之間起呈色反應，以作為判斷還原糖多寡的標準，其結果如圖5。由於總糖和還原糖所測得量均不高，可能為此三種糞肥混菌中，有能夠將纖維素水解產生之糖類轉化為其他物質(如乙醇或氫氣)之菌種。

在乙醇和氫氣的測定上，我們利用氣相層析儀做測定，將所得之值帶入檢量線換算過後得到，其結果如圖6，牛糞混菌群中約三天即能產生約23mM之乙醇、馬糞混菌群中約五天即能產生約24mM之乙醇、鹿糞混菌群中約三天即能產生約22mM之乙醇。在氫氣方面，則為牛糞混菌的產氫效能較為傑出，約能達到整個瓶頂空間的42.57%，馬糞肥混菌的產氫約為29.28%，鹿糞混菌菌群的效果較為不理想，產量約只有3.36%，其結果如圖7。由此結果得知，此三種糞肥混菌群內均有產乙醇或產氫菌，在整個試驗中，我們希望藉由這些數據，期望能夠將纖維水解能力較強、能夠產乙醇或是產氫菌種能夠分離純化出來，並對其作詳細生化特性之分析。

### 2. 纖維水解菌之分離與鑑定

本實驗為能獲得高能纖維水解菌株，嘗試自牛糞、鹿糞及馬糞嗜熱厭氧纖維水解菌群中篩選，目前已獲得共計30株纖維水解菌，分別為來自牛糞: Strain TCW1, 3, 4, 9, 10, 11, 12; 來自鹿糞: Strain D2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18; 來自馬糞: Strain H1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9。來自牛糞菌群之纖維菌株以10g/L  $\alpha$ -cellulose為代表基質培養55°C下如圖8，並以還原醣產生速率為目標篩選出strain TCW1為後續詳細研究之菌株，其還原醣產率為7株菌中最佳表現者，可達72.87mg/L。

Strain TCW1經由DNA萃取，並以PCR技術獲得其16SrDNA供後續菌種的序列分析和

菌種親源鑑定其結果如圖9，發現其相似度高之菌屬為Clostridium sp.，可推斷strain TCW1為Clostridium sp.，然其中相似度最高之菌株Clostridium thermosaccharolyticum對於纖維性基質卻無利用性，而strain TCW1之菌種故無法確定而有待再次確認。

Strain TCW1之菌相方面以相位差顯微鏡(如圖10)以及穿透式電子顯微鏡觀(如圖11)察之，圖10a中可發現strain TCW1為一桿菌，並某些細胞前端有膨大並發亮之現象，推斷為原生孢子結構，而圖10b中為菌株經10分鐘沸水加熱處理後之菌照依然可見未受破壞之細胞，而原生孢子數目增加，顯示strain TCW1確實具Clostridium sp.的代表性孢子結構，此推論也支持了菌種鑑定之結果。圖11為菌體細胞放大之菌照，菌體無鞭毛之結構，而一般實際觀察時也無游動之現象。

在菌種特性分析上選定具代表性之溫度及pH為測試項目，strain TCW1的最適pH為6.7偏酸性(如圖12)，而pH大於8.0以上時便無生長之現象，可推得strain TCW1為生長環境偏酸性之菌株。溫度影響測試結果如圖13，顯示出最適生長溫度為60°C，而溫度大於70°C或小於45°C時生長便相當遲緩。

為了將纖維水解菌以及產氫菌結合應用，本實驗希望以纖維性基質經由生物性的水解醱化程序獲得寡糖類，並由高能產氫菌利用獲得最終的氫氣生質燃料產物，因此後續實驗以期尋找出strain TCW1的最適醱化因子。同樣溫度的測試之下，若以還原醱產生速率亦或是累積量為目標，則可得到最適產糖溫度為65°C，結果如圖14，其現象雷同於最適生長溫度測試大於70°C或小於45°C時並無還原醱產出，然最適還原醱產率溫度65°C卻略大於最適生長溫度60°C，推斷為生物演化過程中，纖維水解酵素為了因應自然環境之溫度變化，故實際耐受溫度需較最適生長溫度高，因此後續糖化因子測試以65°C進行。

基質濃度測試並以最佳還原醱產率為目標，纖維性基質以 $\alpha$ -cellulose為代表而其結果如圖15，可發現基質濃度提升至7g/L以上後其還原醱產率呈現最大值平穩狀態。同樣若是以淨基質水解百分比以及產量來看(如圖16)，strain TCW1自大於3g/L的纖維素後便無法完全水解，一直到大於7g/L的濃度後水解率便維持在約40%，而產量同樣也是以7g/L的纖維素為最佳，可達到約0.6g sugar/g substrate。

由於纖維素的生物性水解倚靠的是纖維水解酵素作用，故酵素糖化程序的影響因子也理應可應用於生物醱化程序，有之前論文指出鈣離子對於纖維水解酵素具有穩定的作用(Mackenzie et al., 1985; Johnson, 1982)，故本實驗先移除原先培養基中鈣離子來源CaCl<sub>2</sub>並調整其濃度自0g/L到0.2g/L，其結果如圖17可發現鈣離子濃度在0g/L到0.02g/L之間對於還原醱產率有明顯的正面效果而之後持平，顯示出最佳鈣離子濃度為0.02g/L。

Strain TCW1針對本實驗之目標，利用狼尾草以及稻桿等天然纖維素物質做為基質來源，實驗以過20mesh濾網的破碎粉末作為基質餵料，其總糖濃度結果如圖18，其產量可達0.13g/g Napiergrass以及0.076g/g rice straw，証實狼尾草以及稻桿確實為具纖維衍生性燃料潛力的來源基質。

### 3.產氫菌分離與鑑定

以南部一廢水處理廠之污泥為菌種來源，建立一高效率產氫泥漿式反應器(Carrier-induced granular sludgebioreactor，簡稱CIGSB)，其產氫效果可達50% H<sub>2</sub>/50% CO<sub>2</sub>，最高產氫速率達7.3L/h/L，產率為4.3 mol H<sub>2</sub>/mol sucrose。從此產氫顆粒污泥中篩選純化出共9株醱酵產氫菌，經16S rDNA序列分析，其中有6株為Clostridium butyricum (CGS1, CGS2, CGS3, CGS4, CGS5, 及CGS6)，2株為Clostridium pasteurianum (CH1, CH4)，及1株Klebsiella sp (圖19)，其中有7株之產氫能力較



強，後續以此七株續做產氫研究。此七株產氫純菌，分別以靜置與搖瓶批次系統加以探討其利用木糖與蔗糖進行批次產氫之效能，並以所得之最佳產氫菌種分別探討不同碳源濃度(木糖5~40 g COD/L；蔗糖5~40 g COD/L)對產氫之影響。以木糖為單一碳源之結果顯示，在靜置與搖瓶批次系統中，僅*C. butyricum* CGS2和CGS5與*Klebsiella*有能力分解木糖產氫，且以搖瓶批次系統為較佳之操作方式，其中以*C. butyricum* CGS5產氫效果最佳，這與過去混菌系統DGGE之結果一致。當木糖濃度為20000 mg COD/L時，*C. butyricum* CGS5之最大產氫速率達212.5 mL/h/L，且產率為0.73 mol H<sub>2</sub>/mol xylose。以木糖產氫之液相代謝產物均以丁酸為主，乙酸次之。此外，在蔗糖為單一碳源之結果顯示，*C. butyricum* CGS2和CGS5、*C. pasteurianum* CH1、CH4、CH5和CH7與*Klebsiella* sp.皆有能分解蔗糖，且以搖瓶批次系統為較佳之操作方式，其中以*C. pasteurianum* CH4產氫效果最佳，此亦符合混菌產氫系統DGGE之結果。*C. pasteurianum* CH4在蔗糖濃度為40000 mg COD/L時可得最大產氫速率(568.4 mL/h/L)與產率(4.14 mol H<sub>2</sub>/mol sucrose)，其液相代謝產物亦均以丁酸為主，乙酸次之。在此些產氫純菌中以*Clostridium butyricum* CGS5具最強之產氫能力。*CGS5*細胞之最佳生長範圍在pH6.0—6.5，但其最佳總產氫量及產氫效率則在pH5.5 (Chen et al., 2005)

#### 4. 纖維素水解液產氫效能評估

##### 4.1. 以alpha-cellulose水解液產氫之初步測試

圖20為利用alpha-cellulose之*Clostridium* strain TCW1水解液為碳源進行暗醱酵產氫之初步測試結果。本醱酵產氫系統以37°C靜置培養，初始pH值為7.5左右，初始還原糖濃度為0.9 g/l，先進行滅菌處理，再利用所分離7株產氫純菌中之3株(*Clostridium butyricum* CGS2, *Clostridium pasteurianum* CH4與*Klebsiella*)進行直接產氫之測試。結果顯示，以*Clostridium butyricum* CGS2有較佳之產氫能力，可獲得之H<sub>2</sub>濃度為14%、H<sub>2</sub> yield為0.011 mmol H<sub>2</sub>/g reducing sugar與1.43 ml H<sub>2</sub>/l。此結果似乎不佳，推測為滅菌後有部分抑制物之生成所導致，因此接續實驗改以過濾方式進行滅菌處理。

##### 4.2. 以含不同還原糖濃度之alpha-cellulose水解液進行醱酵產氫

圖21乃以alpha-cellulose水解液(初始還原糖濃度為2.1 g/l)為碳源進行產氫測試之結果。本系統以37°C靜置培養，初始pH值為7.5，以過濾方式滅菌，並利用本實驗室所分離之7株產氫純菌進行直接產氫之測試。結果顯示，7株產氫純菌皆有產氫之能力，其中以*Clostridium butyricum* CGS5為較佳之產氫菌株，可得H<sub>2</sub>濃度為36%、H<sub>2</sub> yield為2.23 mmol H<sub>2</sub>/g reducing sugar與80.7 ml H<sub>2</sub>/l。

圖22為以alpha-cellulose水解液(初始還原糖濃度為1.3 g/l)為碳源進行產氫測試之結果。本系統以37°C靜置培養，初始pH值為7.5，以過濾方式滅菌，並利用上述7株產氫純菌進行產氫測試。結果顯示，除了*Cl. pasteurianum* CH5以外，其他產氫純菌皆有產氫之能力，其中以*Cl. butyricum* CGS5與*Cl. pasteurianum* CH4皆有不錯產氫效能，其中*Cl. butyricum* CGS5為較佳之產氫菌株，可獲得之H<sub>2</sub>濃度為37%、H<sub>2</sub> yield為2.65 mmol H<sub>2</sub>/g reducing sugar與55.60 ml H<sub>2</sub>/l。

圖23為以alpha-cellulose水解液(初始還原糖濃度為0.9 g/l)為碳源進行產氫測試之結果。本系統以37°C靜置培養，初始pH值為7.5，以過濾方式滅菌，並利用上述7株產氫純菌進行產氫測試。結果顯示，有四株產氫純菌有產氫之能力，其中以*Clostridium butyricum* CGS5為較佳之產氫菌株，可獲得H<sub>2</sub>濃度為15%、H<sub>2</sub> yield為4.99 mmol H<sub>2</sub>/g reducing sugar與4.39 ml H<sub>2</sub>/l。

由以上不同批次之alpha-cellulose水解液產氫效能測試，結果顯示，*C. butyricum*

CGS5為較佳之產氫菌株。但比較*C. butyricum* CGS5以不同alpha-cellulose水解液產氫效率，可發現伴隨著水解產物還原糖濃度之提升，氫氣產量有隨之上升的趨勢，但H<sub>2</sub> yield卻有隨之下降的趨勢（圖24）。此結果可能是因為在第一階段水解過程時，因醱酵水解過程中，有些抑制產物生成，而該抑制物濃度伴隨著水解產物還原糖濃度之提升而提升，因此導致H<sub>2</sub> yield有下降之趨勢。

#### 5.以狼尾草(Napiergrass)水解液進行醱酵產氫

圖25為以狼尾草Napiergrass經纖維水解純菌strain TCW1分解之水解液(初始還原糖濃度為1.8 g/l)為碳源進行產氫測試結果。本系統以37°C靜置培養，初始pH值為7.5，以過濾方式滅菌，並利用7株產氫純菌進行產氫測試。結果顯示，僅有*Clostridium butyricum*有產氫之能力，其中以*Clostridium butyricum* CGS2之菌株為較佳之產氫菌株，可獲得之H<sub>2</sub>濃度為29%、H<sub>2</sub> yield為1.31 mmol H<sub>2</sub>/g reducing sugar與21.1 ml H<sub>2</sub>/l。

## 六、結論

本研究以草食性動物排遺作為植種來源，以纖維濾紙(Whatman No.1)作為纖維素來源，在55°C厭氧條件下馴養，發現此些混合菌群可將濾紙完全分解，培養基中亦測得還原糖及乙醇之產生，證明獲得可水解纖維素之菌群。之後將此纖維水解菌群改以稻桿片段為碳源進行培養，發現該批次反應在55°C下進行一星期後，外觀上可看出稻草有明顯轉為絲狀或破碎情形。目前已從此些混合菌群中篩選純化出30株嗜熱性厭氧纖維水解菌，其中纖維水解效果較好之牛腸胃道分離菌株編號為strain TCW 1, 3, 4, 9, 10, 11及12，經16S rRNA gene sequence初步鑑定，此些嗜熱厭氣菌株為 *Clostridium thermosaccharolyticum* TCW1、*C. thermosaccharolyticum* TCW3、*C. thermosaccharolyticum* TCW4、*C. thermosaccharolyticum* TCW9、*C. thermosaccharolyticum* TCW10、*C. thermosaccharolyticum* TCW11、及 *C. thermosaccharolyticum* TCW12。在進行纖維水解測試，以alpha-cellulose為基質，此7株菌都可將alpha-cellulose完全水解，最高纖維水解速率為0.2 g/hr,最高還原糖產率為72 mg/L。而後續以最高產率者strain TCW1進行CMC-zymogram 而有陽性結果，及 Avicelase assay有0.166  $\mu$  mol/min.mg 比酵素活性，顯示出擁有完整之纖維內切及外切水解系統。而7株纖維水解菌以10g/L狼尾草莖為基質時可達最高450mg/L還原糖累積量，而以10g/L狼尾草葉培養時可達最高550mg/L還原糖累積量。根據初步實驗結果證實，該生物性纖維水解之還原糖產物，可為本研究所篩選出之厭氧產氫菌所利用而產生氫氣。在厭氧產氫純菌之分離篩選方面，分別由不同種類產氫污泥中成功地分離純化得七株產氫純菌，即 *Clostridium butyricum* CGS2、*C. butyricum* CGS5、*Clostridium pasteurianum* CH1、*C. pasteurianum* CH4、*C. pasteurianum* CH5、*C. pasteurianum* CH7與 *Klebsiella* sp.。本研究利用此七株產氫純菌，分別以經纖維水解菌 *Clostridium thermosaccharolyticum* TCW1 水解之纖維素及狼尾草水解液為基質做產氫效果評估，發現僅有 *C. butyricum* 菌株可產氫，說明纖維素水解液產生質能（氫氣）知可行性。

## 七、參考文獻：

1. Ahring, B. K. (1994). Status on science and application of thermophilic anaerobic digestion. *Water, Science and Technology*, 30(2), 241-249.
2. Borghi, A. Del, Converti, A., Palazzi, E., and M. Del Borghi. (1999). Hydrolysis and thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid waste. *Bioprocess Engineering* 20, 553-560.
3. Burrell, P. C., C. O Sullivan, H. Song, W. P. Clarke, and L. L. Blackall. (2004). Identification, detection, and spatial resolution of *Clostridium* populations responsible for cellulose degradation in a methanogenic landfill leachate bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2414-2419.
4. Chang, J.-S., Lee, K.-S., and Lin, P.-J. (2002) "Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors" *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1167-1174.
5. Chen, W-M, Tseng, Z-J, Lee, K-S, and Chang, J-S (2005) "Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge" *Int. J. Hydrogen Energy* 30(10), 1063-1070.
6. Cooney, Charles L., and Donald L. Wise. (1975). Thermophilic anaerobic digestion of solid waste for fuel gas production. *Biotechnology and Bioengineering*, 17(8), 1119-1135.
7. Dubois, M., Gilles, K. A. Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem* 28 : 350-356.
8. Johnson, E. A., Sakajoh, M., Halliwell, G., Madia, A., and Demain, A. L. Saccharification of Complex Cellulosic Substrates by the Cellulase System from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 : 1125-1132.
9. Leal K.; Chacin E.; Behling E.; Gutierrez E.; Fernandez N.; Forster C.F. (1998). A mesophilic digestion of brewery wastewater in an unheated anaerobic filter. *Bioresource Technology*, 65, 51-55.
10. Lee, K-S, Lin, P-J, and Chang, J-S (2006) Temperature effect on hydrogen fermentation in a granular sludge bed induced by activated carbon carrier. *Int. J. Hydrogen Energy* 31(4), 465-472.
11. Lee, K-S, Lo, Y-S, Lo, Y-C, Lin, P-J and Chang, J-S (2004a) "Operation strategies for biohydrogen production with a high-rate anaerobic granular sludge bed bioreactor" *Enzyme Microb. Technol.* 35, 605—612.
12. Lee, K.-S., Wu, J.-F., Lin, P.-J., and Chang, J.-S. (2004b) "Anaerobic hydrogen

production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor” *Biotechnol. Bioeng.* 87 (5), 648-657.

13.Lee, K.-S., Lo, Y.-S., Lo, Y.-C., Lin, P.-J., and Chang, J.-S. (2003) "Hydrogen fermentation with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactors" *Biotechnol. Lett.* 25, 133-128.

14.Mackenzie, C. R., Bilous, D., and Patel, G. B. (1985). Colormetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 : 243-248.

15.Pagilla, K. R., H.-J. Kim and T. Cheunbarn. (2000). Aerobic thermophilic and anaerobic mesophilic treatment of swine waste. *Water Research* 34(10), 2747-2753.

16.Ro , M. and G.. D. Zupan i . (2003). Thermophilic anaerobic digestion of waste activated sludge. *Acta. Chim. Slov.* 50, 359-374.

17.Spiegel, R. J., S.A. Thorneloe, J.C. Trocciola, J.L. Preston. (1999). Fuel cell operation on anaerobic digester gas: conceptual design and assessment. *Waste Management*, 19, 389-399.

18.Updegraff, D. M. 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal. Chem* 32 : 420-424.

19.Van Wyk, J. P.H.. (2001). Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. *Trends in Biotechnology*, 19, 5.

20.Viles, F. J., Jr., and L. Silverman. (1949). Determination of Starch and Cellulose with Anthrone. *Anal. Chem* 21 : 950-953.

21.Wang, C-H, Lin, P-J, and Chang, J-S (2006) Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with a municipal sewage sludge. *Process Biochem.* 41, 1353—1358.

22.Wu, S-Y, Hung, C-H, Lin, C-N, Chen, H-W, Lee, A-S, and Chang, J-S (2006) Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 93(5), 934-946.

23.Wu, S-Y, Lin, C-N, and Chang, J-S (2005) “Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer” *Int. J. Hydrogen Energy* 30(11) 1375-1381.

24.Wu, S.-Y., Lin, C.-N., and Chang, J.-S. (2003) "Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized beds" *Biotechnol. Prog.* 19, 828-832.

25. Wu, S.Y, Lin, C.N., Lee, K.S., Lin, P.J., and Chang, J.S. (2002) "Microbial hydrogen production with immobilized anaerobic cultures" *Biotechnol. Prog.* 18, 921-926.

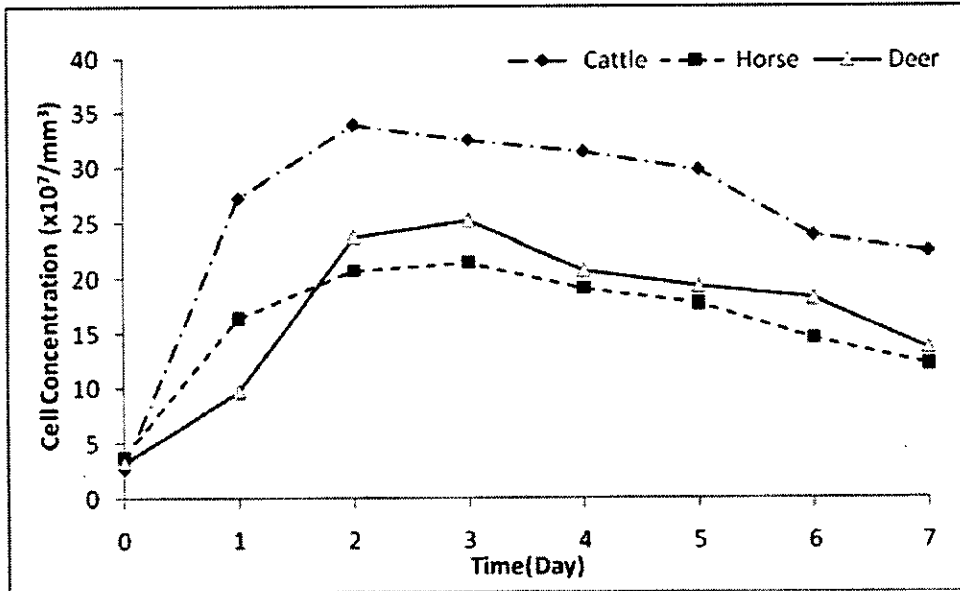


圖 1 牛、馬、鹿糞肥中混菌菌群培養於 55°C 於八天的觀察下生長情形，菌數值是經由血球計數器法直接計算，(◆)為牛糞混菌群，(■)為馬糞混菌群，(△)為鹿糞混菌群。

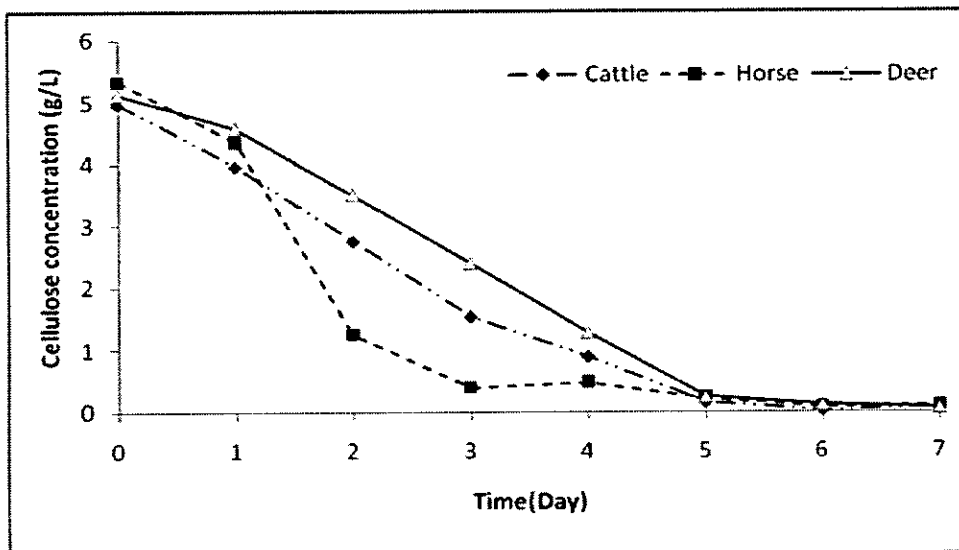


圖 2 牛、馬、鹿糞肥中混菌菌群將解  $\alpha$ -cellulose (5g/L) 的情況，(◆)為牛糞混菌群，(■)為馬糞混菌群，(△)為鹿糞混菌群。

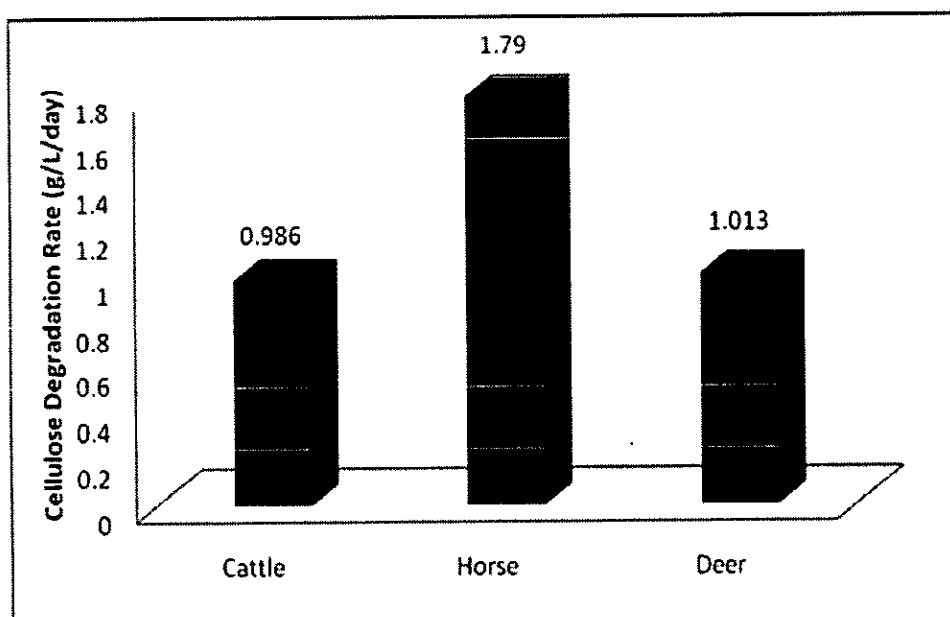


圖 3 糞肥中混菌群之  $\alpha$ -cellulose (5g/L) 降解速率圖，柱上數字代表其每天約所能水解纖維素之克數，由圖可知馬糞混菌群中有能力較佳的纖維水解菌種。

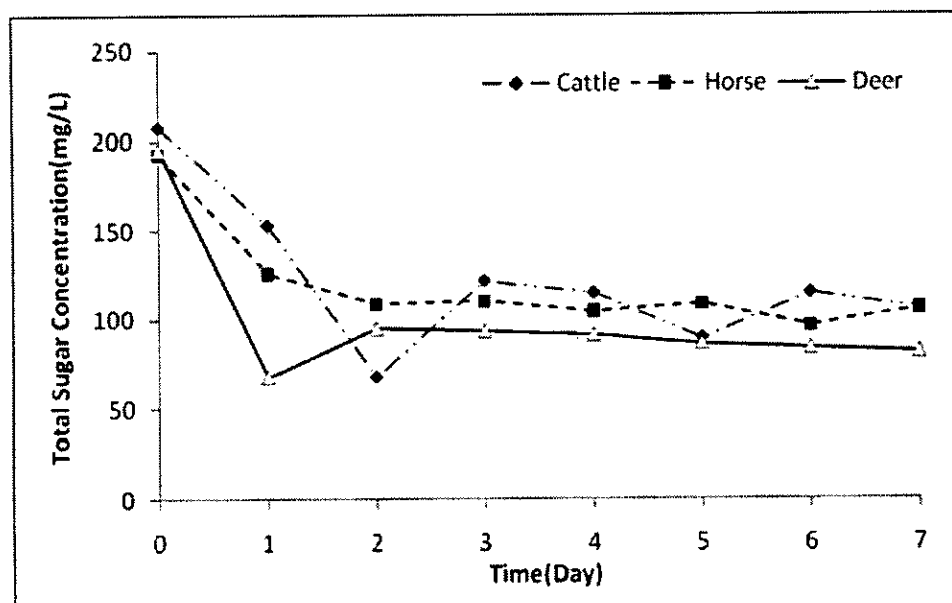


圖 4 總糖濃度示意圖，(◆)為牛糞混菌群，(■)為馬糞混菌群，(△)為鹿糞混菌群。



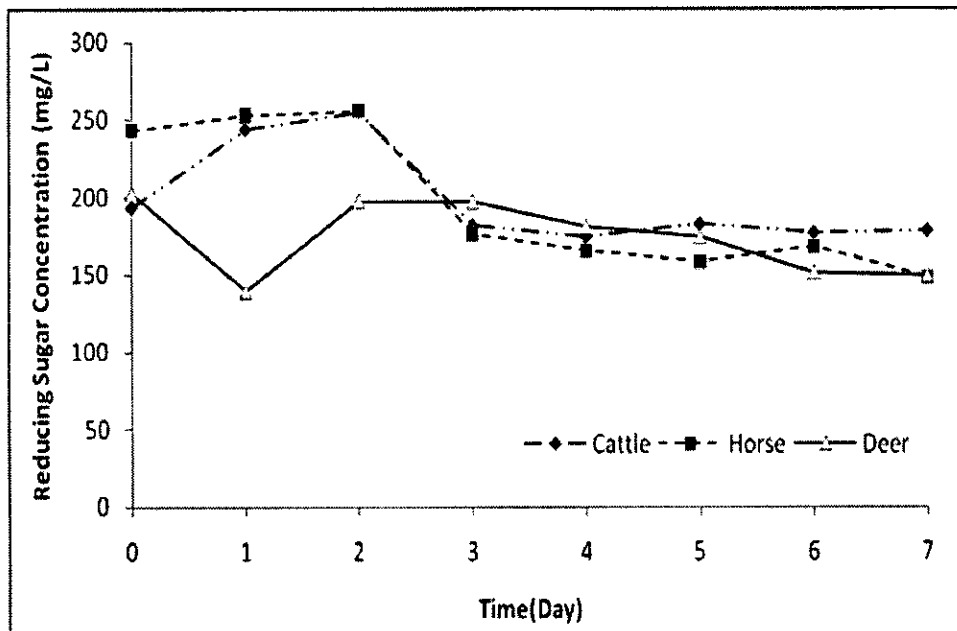


圖 5 還原糖濃度示意圖，(◆)為牛糞混菌群，(■)為馬糞混菌群，(△)為鹿糞混菌群。

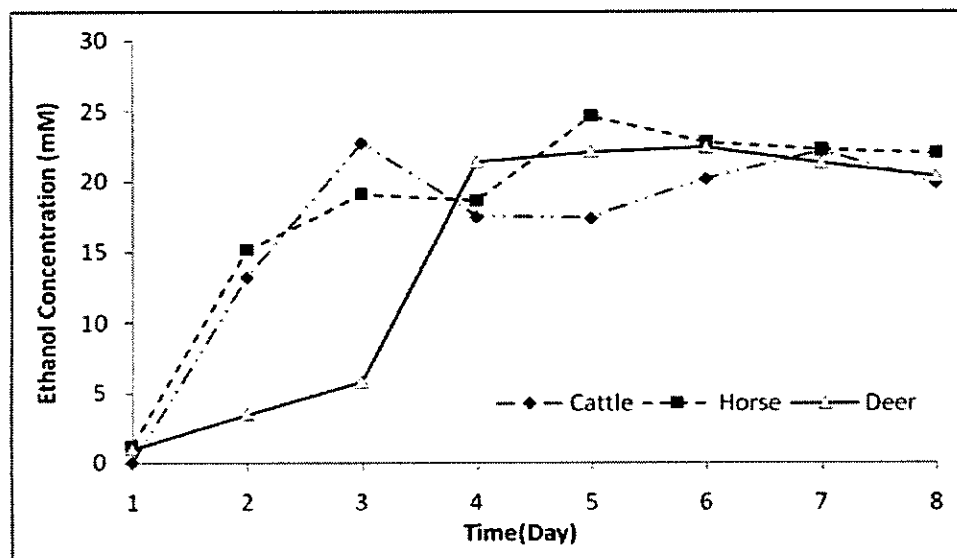


圖 6 乙醇濃度示意圖，(◆)為牛糞混菌群，(■)為馬糞混菌群，(△)為鹿糞混菌群。

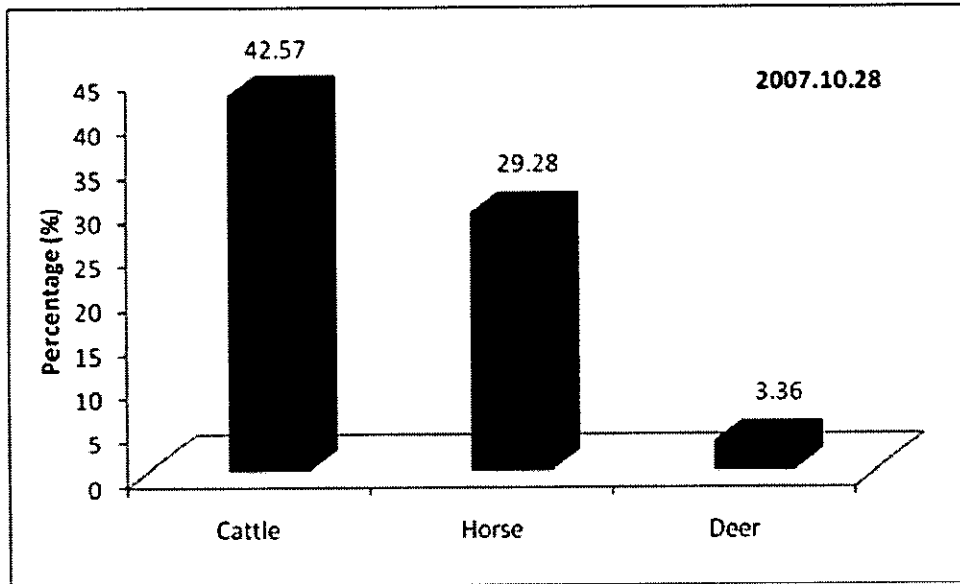


圖 7 最終氮氣體積百分比示意圖，由圖可知馬糞混菌群中有產氮能力較佳的菌種。

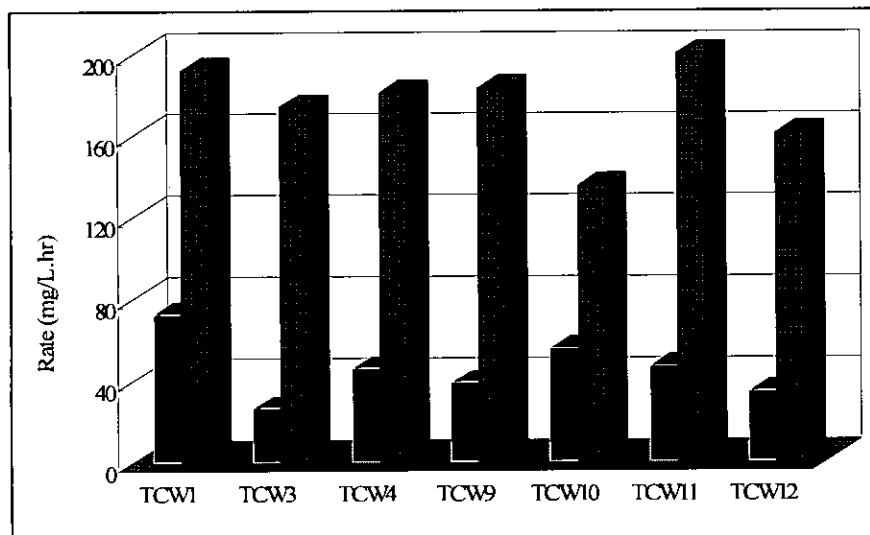


圖 8 來自牛糞纖維水解菌群之 7 株纖維水解菌培養於 55°C 下以  $\alpha$ -cellulose(10/L) 為基質，其纖維水解率(灰)以及還原糖產率(黑)能力比較之下，strain TCW1 都有較佳的表現。

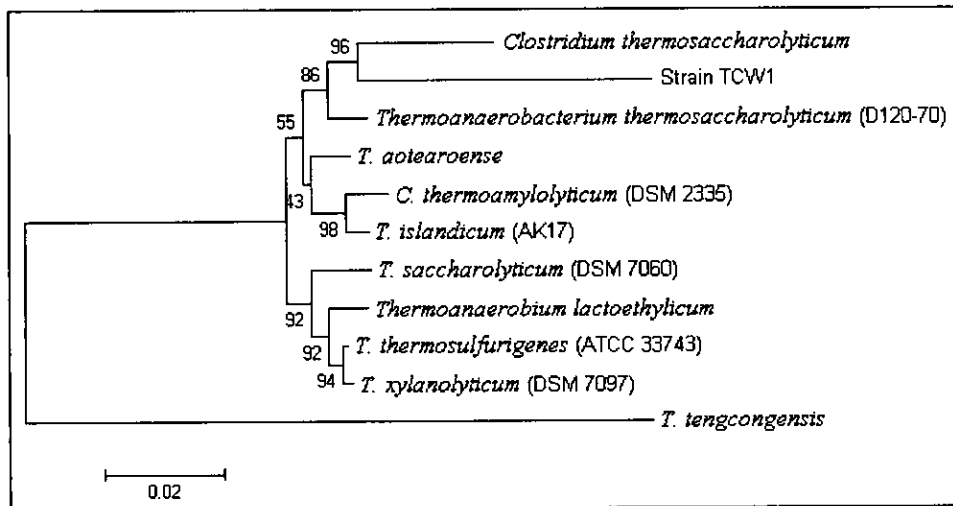


圖 9 Strain TCW1 的親源樹圖，其 16SrDNA 序列跟 *Clostridium thermosaccharolyticum* 之相似度高達 99%，bootstrap number 為 500。

A



B

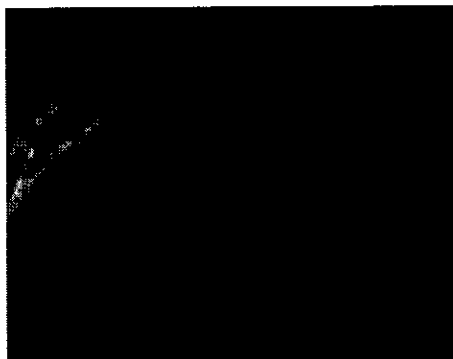


圖 10 Strain TCW1 之相位差顯微鏡菌照。(A)為長桿狀菌並有前端膨大的原生孢子結構。(B)為經 10 分中沸水處理後，顯示之菌體依然存活，同時孢子結構有增多趨勢。

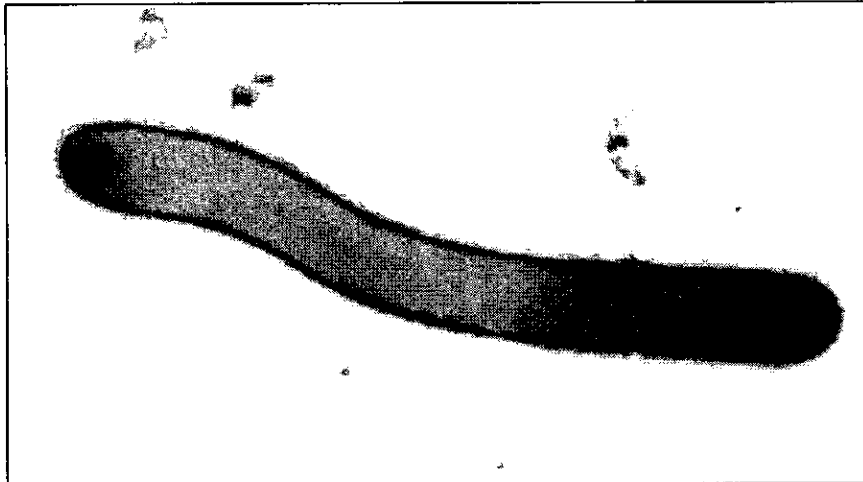


圖 11 Strain TCW1 之穿透式電子顯微鏡菌照。

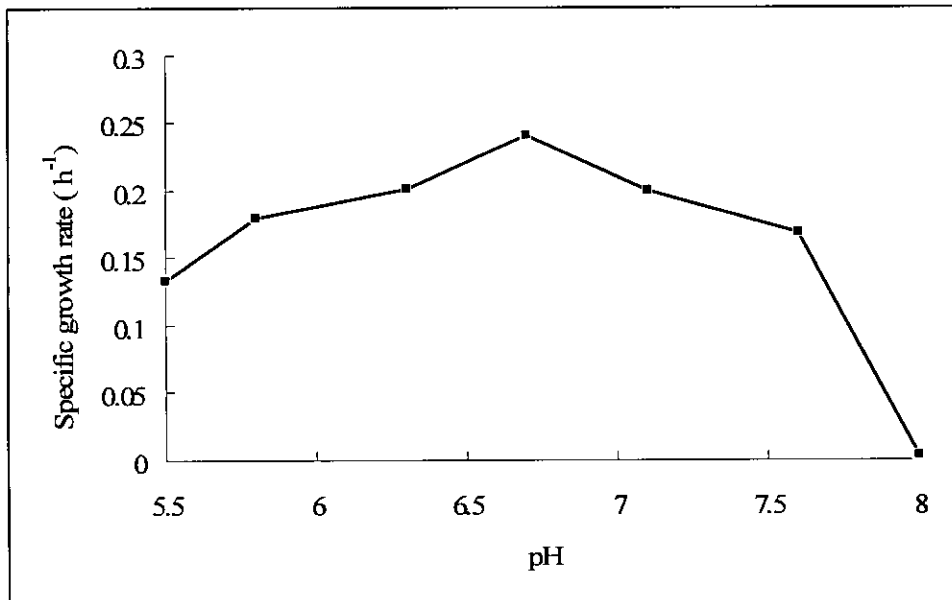


圖 12 Strain TCW1 的生長最適 pH 測試，其最佳 pH 約為 6.7。

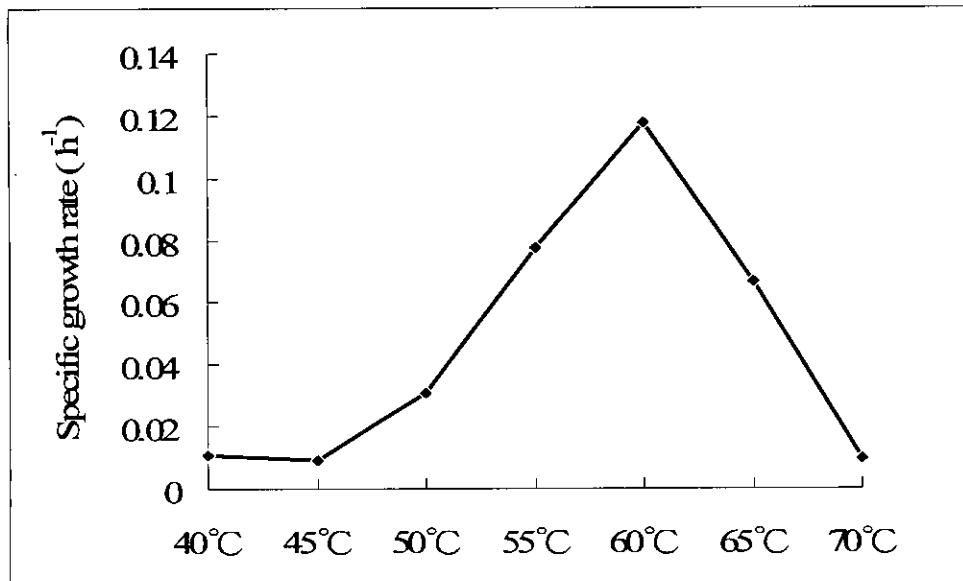


圖 13 Strain TCW1 的生長最適溫度測試，其最佳溫度約為 60°C。

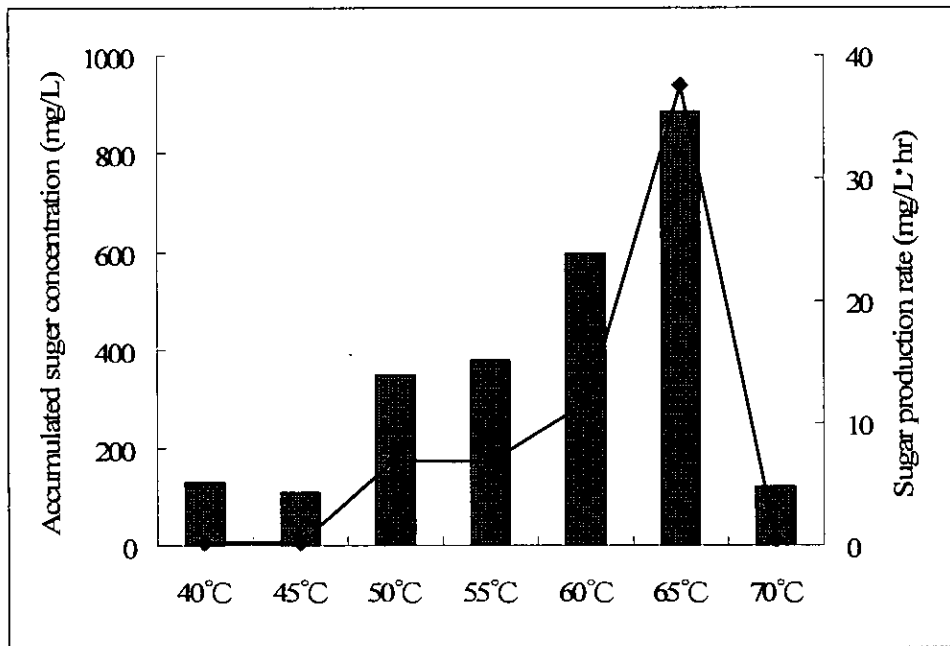


圖 14 Strain TCW1 的還原糖產率(黑點)以及累積糖濃度(灰條)最適溫度測試，其最佳溫度約為 65°C。

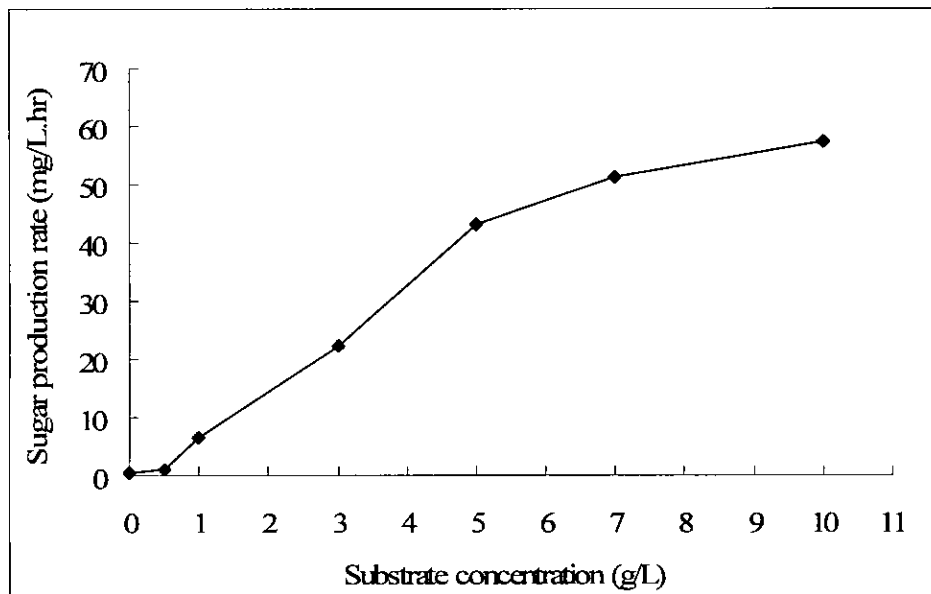


圖 15 Strain TCW1 的還原糖產率最適基質濃度測試。

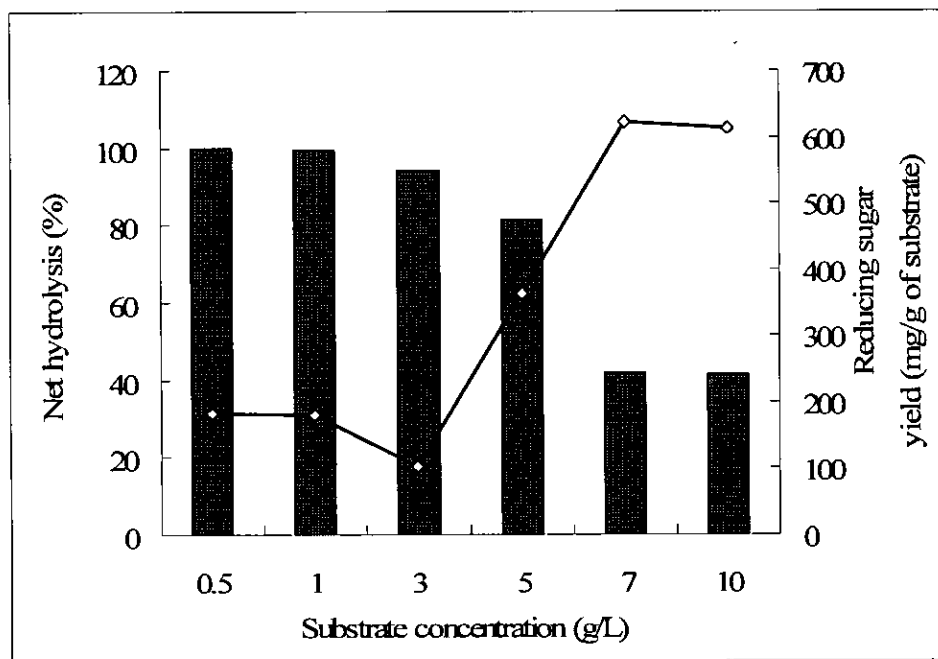


圖 16 Strain TCW1 的實際纖維素水解百分比(灰條)以及產量(白點)的最適基質濃度測試，顯示 7g/L 纖維素為最佳基質餵料量。

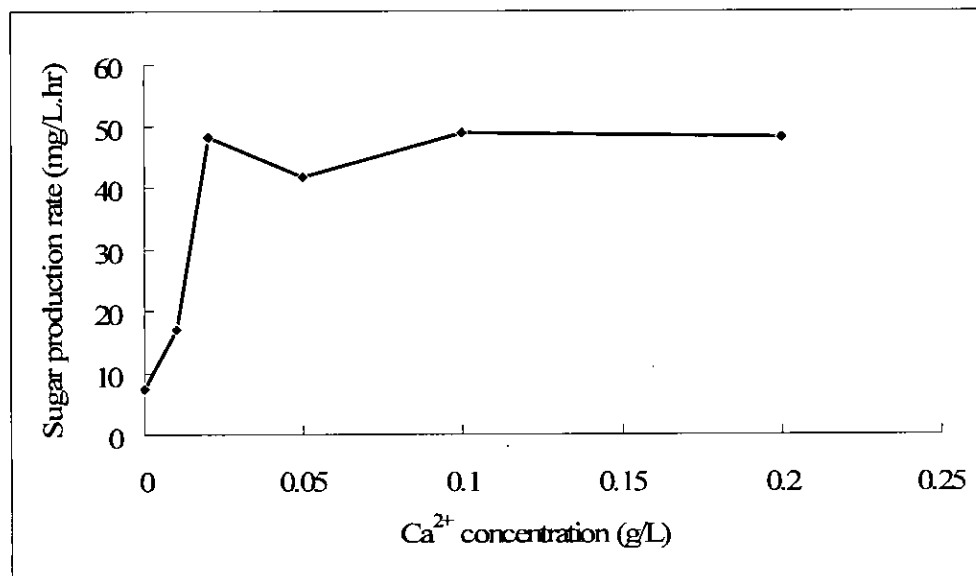


圖 17 鈣離子(CaCl<sub>2</sub>)濃度對於 strain TCW1 纖維素糖化之影響，結果顯示 0.02g/L 的鈣離子為最佳添加量。

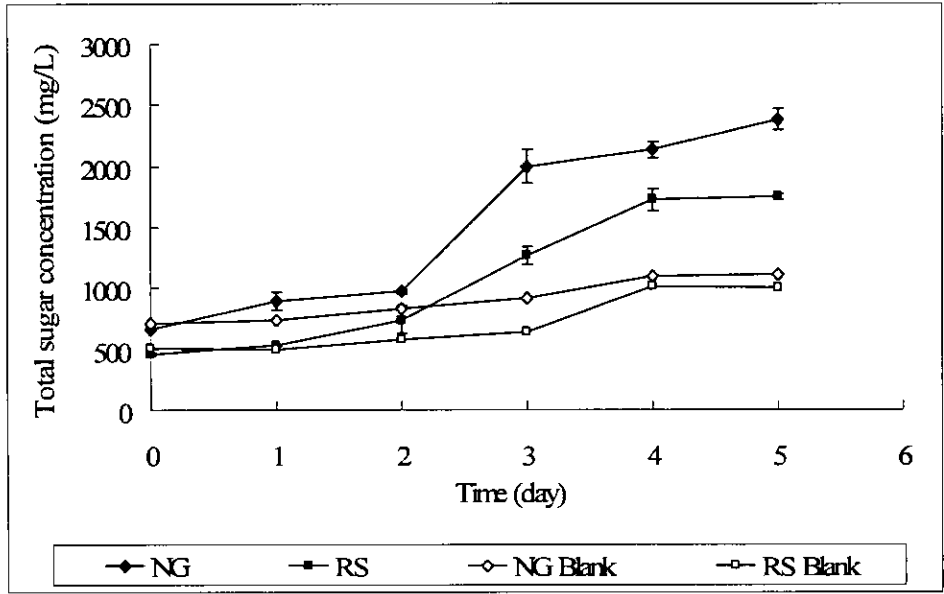


圖 18 Strain TCW1 以自然纖維性物質狼尾草(NG)以及稻稈(RS)作為基質測試，結果顯示有實際的生物水解並有總糖產生，產量可達 0.13g/g Napiergrass 以及 0.076g/g rice straw，實驗以未植菌組為 Blank。



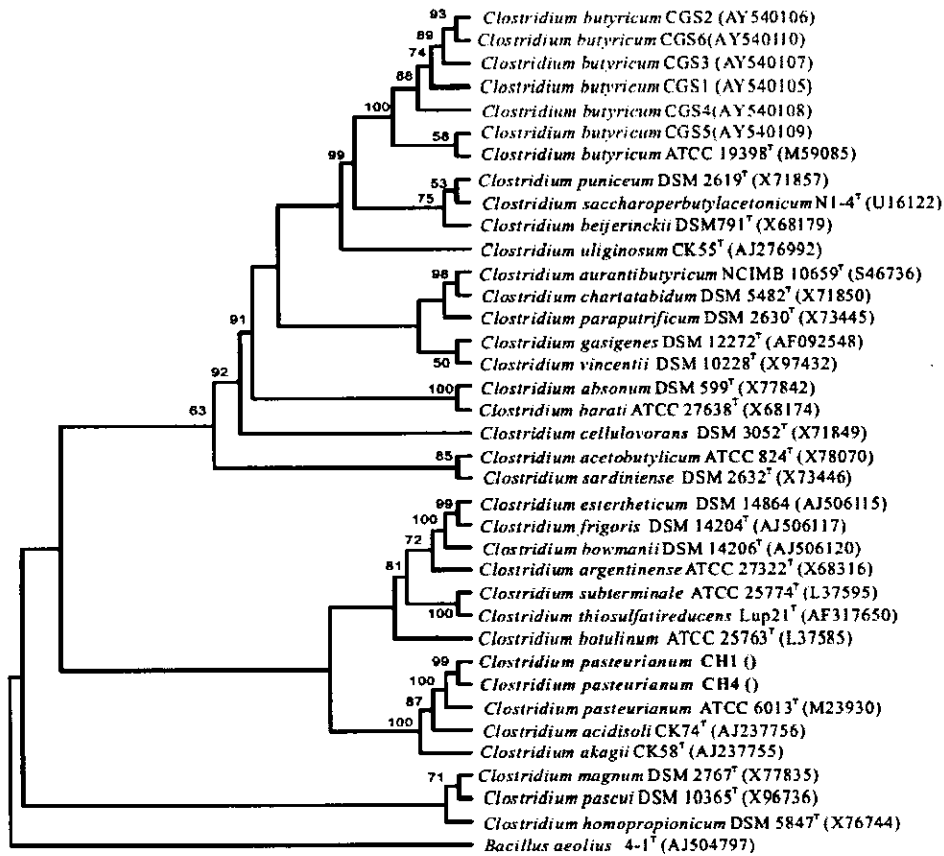


圖 19 分離產氫菌之 16S rRNA gene 分析親源樹圖。其中 6 株為 *Clostridium butyricum*，分別名為 *Clostridium butyricum* strain CGS1，CGS2，CGS3，CGS4，CGS5，及 CGS6。兩株為 *Clostridium pasteurianum*，分別名為 *Clostridium pasteurianum* CH1，CH4。

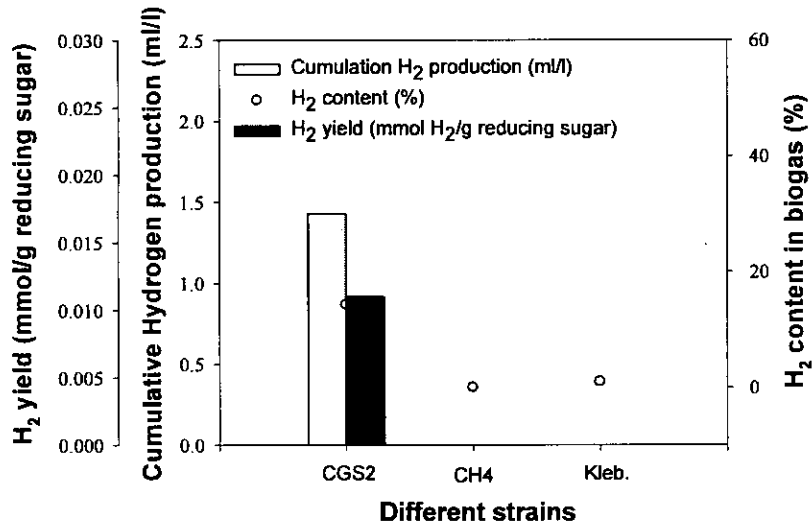


圖 20、以 $\alpha$ -cellulose 為碳源進行產氫測試圖

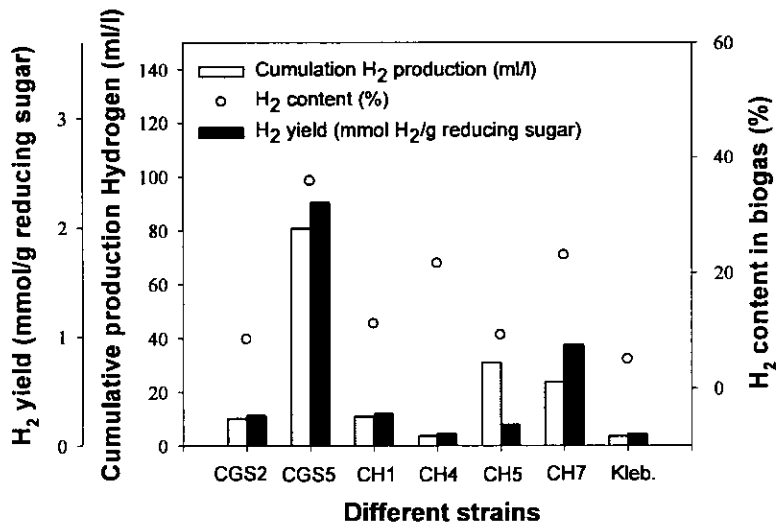


圖 21 以 $\alpha$ -cellulose 水解液(初始還原糖濃度為 2.1 g/l)為碳源進行產氫測試圖。

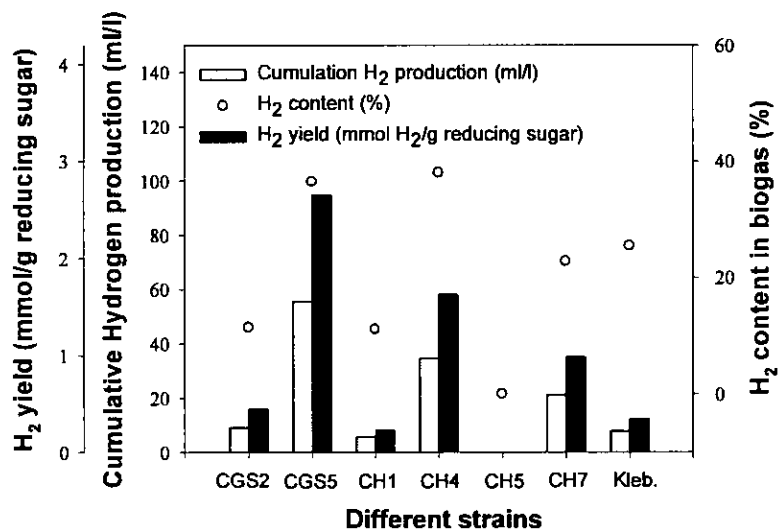


圖 22 以 $\alpha$ -cellulose 水解液(初始還原糖濃度為 1.3 g/l)為碳源進行產氫測試圖。

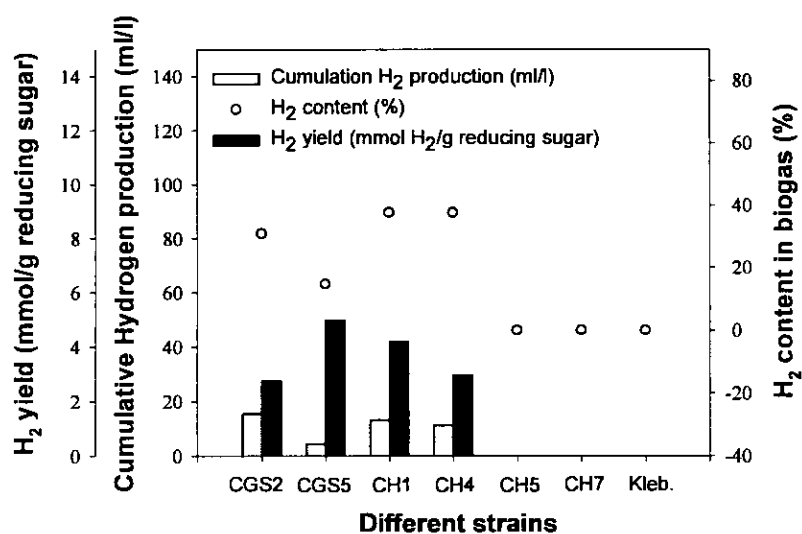


圖 23 以 $\alpha$ -cellulose 水解液(初始還原糖濃度為 0.9 g/l)為碳源進行產氫測試圖。

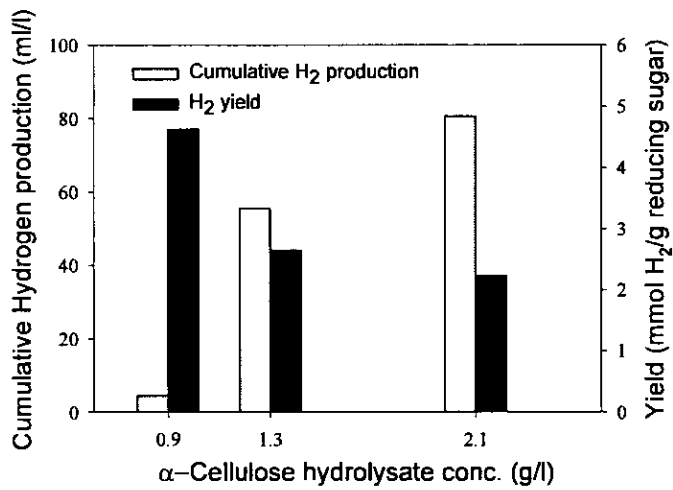


圖 24 *Clostridium butyricum* CGS5 以來自不同 $\alpha$ -cellulose 水解還原糖濃度產氫效果之評估。

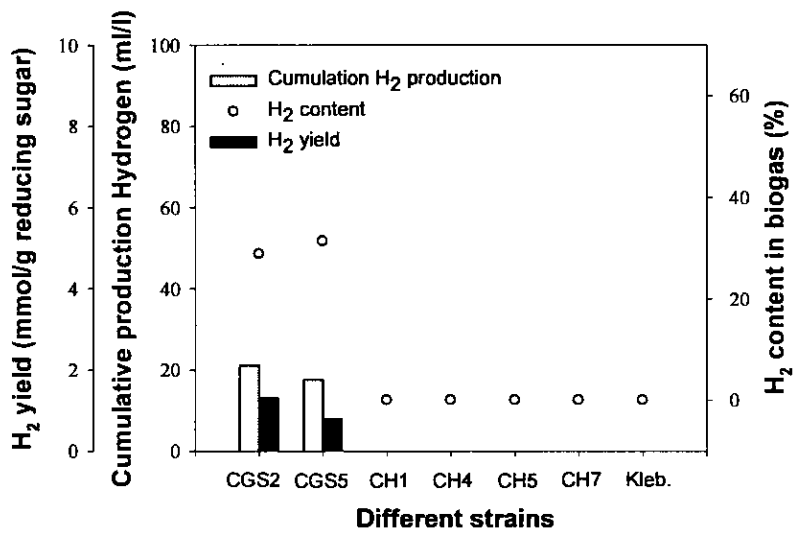


圖 25 以狼尾草 Napiergrass 水解液(初始還原糖濃度為 1.8 g/l)為碳源進行產氫效果評估。