

東海大學環境科學與工程學系

碩士論文

以草食性蜥蜴之腸道菌群進行嗜熱暗醱酵纖維水
解產氫之研究

Thermophilic dark hydrogen fermentation from
cellulose by using enteric microflora of the
herbivorous lizard *Green Iguana*

指導老師：黃啟裕 博士

研究生：吳玥禎

中華民國 一百零一年六月

June 2012

東海大學碩士班研究生
論文指導教授推薦書

環境科學與工程學系吳玥禎君所提之論文

題目：以草食性蜥蜴之腸道菌群進行嗜熱暗醱酵纖維水解產氫之研究

Thermophilic dark hydrogen fermentation from cellulose by using enteric microflora of the herbivorous lizard *Green Iguana*

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授：黃啟裕 (簽章)

101 年 6 月 25 日

東海大學環境科學系碩士班

論文口試委員審定書

環境科學與工程學系碩士班吳玥禎君所提之論文

題目：以草食性蜥蜴之腸道菌群進行嗜熱暗醱酵纖維水解產氫之研究

Thermophilic dark hydrogen fermentation from cellulose by using enteric microflora of the herbivorous lizard *Green Iguana*

經本委員會審議，認為符合碩士資格標準。

論文口試委員召集人 鄧獻文 (簽章)

委員 鄭幸唯

黃啓裕

中華民國 101 年 6 月 25 日

摘要

鑑於今日地球能源主要依賴化石燃料，隨著化石燃料的大量開採及使用，人類即將面對的是化石燃料的耗盡及環境污染的問題。為了解決能源短缺及環境惡化的問題，開發替代能源是全球一重要的課題。氫氣是個具有潛力的再生能源，它可利用厭氧微生物在不需光照之下，將有機廢棄物如纖維素經暗醱酵分解轉化而產生，因此具有低成本、減廢與資源回收再利用的優點。本研究利用爬蟲動物綠鬣蜥 (*Iguana iguana*) 之腸道混合菌群進行纖維水解產氫，發覺有類似瘤胃微生物水解纖維產氫的效果。本研究探討不同溫度、pH 值與亞鐵離子濃度對爬蟲類腸道菌群產氫的影響。同時利用反應曲面法 (Response surface methodology, 簡稱 RSM) 以及統計分析探討溫度、pH 值以及亞鐵離子濃度對產氫的最佳培養條件。經由實驗結果得知，本混合菌群培養在 57.5°C、初始 pH 值為 7.8 且亞鐵離子濃度為 100 mg/L 時可得到最佳的產氫速率 (HPR) 為 19.8 mL/L/hr。在最佳的培養條件下纖維素的水解速率為 0.13 g/L/hr。在醱酵產氫中，醋酸 (1.5 g/L) 及乙醇 (1.2 g/L) 為本混合菌群兩個主要的代謝產物。

關鍵字：氫氣、暗醱酵、纖維素、綠鬣蜥、反應曲面法

Abstract

Considering energy crisis and global environmental impacts, such as greenhouse effect and resource recovery, development of non-polluting and renewable alternative energy is a global important issue. Hydrogen is a potential renewable energy carrier. It can be produced via dark fermentation from organic materials such as cellulosic wastes by anaerobic microorganisms without illumination, through which benefits of low-cost, waste reduction and resource recycling can be achieved. Cellulose was converted into H₂ in batch experiment by a mixed culture enriched from enteric microflora of the reptile green iguana (*Iguana iguana*) in this study. The results showed that the cellulose digestibility by green iguana enteric flora was similar to that of ruminant mammals. Effects of different temperatures, pH's and ferrous ion concentrations on H₂ production were examined. Statistical experimental design methodology was used to evaluate optimal conditions for H₂ fermentation. With response surface methodology (RSM) analysis, the optimal conditions for H₂ production by the mixed culture occurred at 57.5°C, pH7.8 and ferrous concentration of 100 mg/L with maximum H₂ production rate (R_{max}) of 19.8 mL/hr. Cellulose degradation rate was 0.13 g/L/hr under optimal conditions. Acetate (1.5 g/L) and ethanol (1.2 g/L) were the two major soluble metabolites detected at the end of H₂ fermentation by this mixed culture.

Keywords: Hydrogen, dark fermentation, cellulose, green iguana, response surface methodology

目錄

第一章 前言	1
1.1 研究動機	1
1.2 研究目的	2
第二章 文獻回顧	4
2.1 能源	4
2.1.1 不可再生能源	4
2.1.2 再生能源	5
2.2 生質能	5
2.3 氫氣的產生方式	6
2.3.1 熱化學法	6
2.3.1.1 蒸氣重組法	6
2.3.1.2 煤炭氣化反應	6
2.3.1.3 部分氧化法	8
2.3.2 電化學法	8
2.3.2.1 電解法	8
2.3.2.2 光電解法	8
2.3.3 生物法	8
2.3.3.1 光合作用	8
2.3.3.1.1 直接光解作用	8
2.3.3.1.2 間接光解作用	9
2.3.3.2 醱酵作用	9
2.3.3.2.1 光醱酵	9
2.3.3.2.2 暗醱酵	11
2.4 厭氧纖維水解醱酵產氫	12

2.4.1 基質	13
2.4.1.1 纖維素的結構	14
2.4.2 纖維水解產氫菌群來源	15
2.4.3 纖維水解機制	15
2.4.4 暗醱酵產氫機制	19
2.4.5 暗醱酵產氫程序影響因子	22
2.4.5.1 溫度	22
2.4.5.2 pH 值	22
2.4.5.3 鐵、鎳離子	23
2.5 實驗設計方法	24
2.5.1 因子設計	24
2.5.2 田口設計	25
2.5.3 反應曲面法	25
2.5.3.1 實驗設計流程	27
第三章 材料與方法	29
3.1 實驗設計流程	29
3.2 菌株來源	29
3.3 菌株培養	29
3.3.1 厭氧操作	29
3.3.2 嗜熱厭氧培養基	32
3.4 植種品質	32
3.4.1 前培養時間	32
3.4.2 菌群穩定性試驗	33
3.5 環境因子之影響	36
3.5.1 溫度	36

3.5.2 pH 值	36
3.5.3 微量元素 (Fe ²⁺ 和 Ni ²⁺)	36
3.5.4 亞鐵離子濃度	37
3.6 生物產氫潛能	37
3.7 RSM 實驗設計	38
3.7.1 產氫最佳條件設定	38
3.7.2 中心混成設計	38
3.7.3 RSM 實驗操作	39
3.7.4 統計分析	41
3.8 分析方法	41
3.8.1 細胞生長分析	41
3.8.2 纖維素濃度測定	42
3.8.3 總溶解醣濃度測定	43
3.8.4 氣相產物分析	43
3.8.5 液相產物分析	43
3.8.6 產氫能力分析	44
第四章 結果與討論	46
4.1 纖維素降解混合菌群之增富培養	46
4.1.1 前培養時間對纖維水解產氫的影響	48
4.1.2 菌群穩定性測試	50
4.1.3 生長曲線	51
4.2 環境因子之影響	53
4.2.1 溫度對生長、纖維素水解及產氫的影響	53
4.2.2 pH 值對生長、纖維素水解及產氫的影響	55
4.2.3 微量元素 (Fe ²⁺ 、Ni ²⁺) 對生長、纖維素水解及產氫的	

影響	58
4.2.4 亞鐵離子濃度對生長、纖維素水解及產氫的影響...	60
4.3 RSM 實驗設計	62
4.3.1 產氫最佳條件設定	62
4.3.2 中心混成實驗之產氫結果	62
4.3.3 產氫速率之最適培養條件	66
4.3.4 纖維水解產氫最適化驗證	70
第五章 結論與建議	74
5.1 結論	74
5.2 建議	75
參考文獻	76
附錄	84

圖目錄

Fig.2-1 Schemetic diagram of anaerobic cellulose degradation	11
Fig.2-2 Composition of lignocellulose	13
Fig.2-3 Cellulose structure diagram.(a) Scheme of the primary structure of cellulose (b) Scheme of the structure of a cellulose fibril	14
Fig.2-4 Cellobiose hydrolysis into two glucose molecules.	17
Fig.2-5 Conversion of cellulose into fermentation product glucose by an engineered strain of <i>Clostridium cellulolyticum</i> (strain CC-pMG8).....	18
Fig.2-6 Hydrogen fermentation from cellulose.....	20
Fig.2-7 Generation of hydrogen with simultaneous production of acetate (a) and butyrate (b) via glycolysis. Extra molecular hydrogen can be generated in the case of acetate production by NADH that is generated during glycolysis	21
Fig.2-8 Design or response surface methodology (a) Central composite design (b) Box-Behnken.....	26
Fig.2-9 Flowchart of experimental design.....	28
Fig.3-1 Schematic flowchart of experimental design.....	30
Fig.3-2 Schematic diagram of Hungate gas station.....	31
Fig.3-3 Schematic diagram of determines biogas volume	38
Fig.4-1 Phase-contrast micrographs of green iguana enteric microflora mixed culture	46
Fig.4-2 Biodegradation of filter paper by anaerobic microorganisms from lizard fecal. Cultures were growth with 5 g/L filter paper	47

Fig.4-3 Microbial growth (a), cellulose degradation percentage (b), cumulative hydrogen production (c) as well as H ₂ yield and hydrogen production rate (d) of green lizard enteric bacteria with 5 g/L α-cellulose at different pre-culture time at 55°C ...	49
Fig.4-4 Effect of continuous sub-culture on cellulose degradation rate and hydrogen production rate	50
Fig.4-5 Developments of operating pH (a), microbial growth (b), cellulose degradation percentage (c), sugars content (d), cumulative H ₂ production (e) as well as soluble metabolic (f) of green lizard enteric bacteria with 5 g/L α-cellulose at 55°C ...	52
Fig.4-6 Microbial growth (a), cellulose degradation percentage (b), cumulative hydrogen production (c) as well as H ₂ yield and hydrogen production rate (d) of green lizard enteric bacteria with 5 g/L α-cellulose at different temperature	54
Fig.4-7 Microbial growth (a), cellulose degradation percentage (b), cumulative hydrogen production (c) as well as H ₂ yield and hydrogen production rate (d) of green lizard enteric bacteria with 5 g/L α-cellulose at different initial pH at 55°C	57
Fig.4-8 Microbial growth (a), cellulose degradation percentage (b), cumulative hydrogen production (c) as well as H ₂ yield and hydrogen production rate (d) of green lizard enteric bacteria with 5 g/L α-cellulose at different trace element at 55°C	59
Fig.4-9 Microbial growth (a), cellulose degradation percentage (b), cumulative hydrogen production (c) as well as H ₂ yield and hydrogen production rate (d) of green lizard enteric bacteria	

with 5 g/L α -cellulose at different iron concentration at 55°C 61

Fig.4-10 The design range of RSM ◦ (a) Temperature (50-65°C) 、 (b)
initial pH (6-8) and (c) iron concentration (50-500 mg/L)
..... 63

Fig.4-11 Response surface plot and its contour plot for H₂ production
rate: effects of initial pH and temperature..... 67

Fig.4-12 Response surface plot and its contour plot for H₂ production
rate: effects of initial pH and iron concentration..... 68

Fig.4-13 Response surface plot and its contour plot for H₂ production
rate: effects of temperature and iron concentration. 69

Fig.4-14 Developments of operating pH (a), microbial growth (b),
cellulose degradation percentage (c), sugars content (d),
cumulative H₂ production (e) as well as soluble metabolic (f)
of green lizard enteric bacteria with 5 g/L α -cellulose at 57.5°C ,
pH 7.8 and iron concentration 100 mg/L..... 72

表目錄

Tab.2-1 Global fossil fuel mining life	5
Tab.2-2 Hydrogen production method.....	7
Tab.2-3 Comparison of advantages and disadvantages from different biohydrogen production method	10
Tab.2-4 Comparison of cell wass compositions in different plant biomass	13
Tab.2-5 Different seed source for H ₂ fermentation	16
Tab.2-6 2 ³ factorial design.....	25
Tab.2-7 Plan for L ₉ Taguchi design (3 ⁴)	26
Tab.3-1 Basal composition of thermophilic anaerobic medium.....	33
Tab.3-2 Composition of trace element solution	34
Tab.3-3 Composition of vitamin solution	35
Tab.3-4 Relationship of initial pH tested and addition of NaHCO ₃ concentration.	36
Tab.3-5 Experimental design for optimizing fermentative hydrogen production process	40
Tab.4-1 Comparison of cellulose hydrolysis and H ₂ production potential by lizard enteric mixed culture at different temperatures	53
Tab.4-2 Effect of initial pH values on hydrogen fermentation	56
Tab.4-3 Comparison of cellulose hydrolysis and H ₂ production potential by lizard enteric mixed culture at different pH	56
Tab.4-4 Effect of nickel and ferrous ions on the specific growth rate, cellulose degradation of hydrogen production by the iguana enteric mixed culture	58

Tab.4-5 Effect of iron concentration on hydrogen production from different substrates by various microbial sources.....	60
Tab.4-6 Experimental design for optimizing fermentative hydrogen production process and the corresponding experimental results	65
Tab.4-7 Estimated regression coefficients for HPR	70
Tab.4-8 Comparison of hydrogen production rate with optimal conditions in this study to the results of other literatures	73

第一章 前言

1.1 研究動機

工業革命至今將能源轉換成電能與機械動能時，帶來食衣住行的進步，因此能源是人類一切活動最重要的基本要件。昔日人類所使用的能源以化石燃料（fossil fuel，指石油、煤和天然氣）與核能為主，由於化石燃料在地球上之蘊藏量是有限的，加上經濟快速發展使得人類對能源的需求日益增加（2010 年世界石油消耗量比 2009 約增加了 270 萬桶/日）（BP Statistical Review of World Energy, June 2011）。由於人類過度的使用化石燃料，使得環境污染及能源枯竭的問題日趨嚴重。就環境污染問題來說，由於化石燃料燃燒時會排放 CO_2 、 NO_x 、 C_xH_x 和 SO_x ，造成全球暖化、海平面上升、酸雨等。就能源枯竭問題來說，全球的石油尚可開採 46.2 年、天然氣尚可開採 58.6 年，而煤炭則有較長的開採年限 118 年（BP Statistical Review of World Energy, June 2011）。由於這兩大因素使得找尋乾淨、可再生的替代能源是目前相當重要的課題。由於台灣土地面積狹小，自然資源相對貧瘠，大部分的能源（約 98%）主要仰賴進口，因此更需要積極的開發新的替代能源，如太陽能、水力、風力、生質能、地熱能以及潮汐能等。目前政府的政策針對太陽能、風力和生質能皆有相關的獎勵補助措施，可見政府對再生能源的重視。

生質能泛指利用有機物質或生物質（Biomass）轉換成可利用的生質能。由於生質能源可經由廢棄物轉化而得，以取代目前所使用的化石燃料，並可達到廢棄物減量的目的。早期台灣是以稻米為主食的農業國家。根據行政院農委會 98 年的統計結果顯示稻米的年產量高達 157 萬公噸，進而產生大量富含有機性木質纖維之農業廢棄物（499 萬公噸）。除了有大量農業廢棄物之外，木材與林業及畜牧業等亦會

產生許多富含有機物質的廢棄物，也可做為生質能源的饋料。利用木質纖維素為基質轉化產生能源含有下列之優點：(1) 可解決能源危機亦不會造成環境的污染 (2) 可處理過多的廢棄物，也不會造成糧食短缺的問題。產生的生質能源主要可分為酒精、柴油、氫氣或甲烷，但由於燃燒酒精、柴油或甲烷仍會產生二氧化碳造成溫室效應。

在許多替代能源中氫能被認為為可解決各種與能源及環境相關問題的能源，因為它是種潔淨、可再生、具有高熱值 (141.79 MJ/kg) 並且在燃燒後只產生水之燃料。在傳統的產氫方法中，氫氣主要來自碳氫化合物的改造 (部分氧化法，Partial oxidation)、藉由天然氣或輕油在高溫的情況下與蒸氣反應 (蒸氣重組法，Steam reforming) 或者是電解水 (Electrolysis) (Fan *et al.*, 2008)。這些傳統的方法不僅能源的密集性不佳，且對環境而言並不友善。因此就環保的觀點而言，利用生物方法產氫對環境是較為友善作法，因此萌發生物產氫的想法。

1.2 研究目的

本研究是利用綠鬚蜥腸道菌群作為植種來源將纖維素水解並產生氫氣。為了使本菌群能夠更有效地直接水解纖維素並產生氫氣，對各項因子進行探討，其探討因子如下：

1. 前培養時間。
2. 菌群穩定性。
3. 溫度。
4. pH 值。
5. 不同種類的金屬離子 (Fe^{2+} 和 Ni^{2+})。
6. 不同濃度之亞鐵離子。

並利用反應曲面法 (response surface methodology ; RSM) 取得最佳的產氫速率。

第二章 文獻回顧

2.1 能源

過去人類一直所使用的能源為不可再生的，直到爆發了第一次能源危機且全球氣候異常等現象後，人類驚覺這類的能源不能夠永續的使用。因此，再生能源的使用及相關的研究逐漸為人重視。

2.1.1 不可再生能源 (Non-Renewable energy)

工業革命至今將能源轉換成電能與機械動能時，帶來食衣住行的進步，因此能源是人類一切活動最重要的基本要件。昔日人類所使用的能量以石化燃料（石油、煤和天然氣）與核能為主，由於地球上之蘊藏量是有限的，加上經濟快速發展使得人類對能源的需求日益增加（2010 年世界石油消耗量比 2009 約增加了 270 萬桶/日）（BP Statistical Review of World Energy, June 2011），依目前的消耗速度，全球的石油尚可開採 46.2 年、天然氣 58.6 年而煤炭則有較長的開採年限 118 年（Tab. 2-1）。除了蘊藏量短缺的問題外，燃燒石化燃料時所產生的 CO_2 、 NO_x 、 C_xH_x 和 SO_x 造成全球暖化、海平面上升、酸雨等環境污染問題。

除了石化燃料，另一種最常使用的能源為核能。根據國際原子能總署（International Atomic Energy Agency, IAEA）於 2007 年發佈的紅皮書（*Uranium 2007: Resources, Production and Demand*）中指出全球鈾礦的蘊藏量約有 550 萬噸。但根據 IAEA 估計，全球鈾礦的需求量由 2008 年的 6.65 萬噸/年將快速的增加至 9.4 萬噸/年甚至是 12.2 萬噸/年，因此鈾礦的開採量約剩下 50 年。除了有限的蘊藏量之外，開採的過程當中容易發生輻射物質外洩造成的環境污染。此外，使用核能所產生的核廢料更造成環境的一大傷害。因此基於環境保護及資

源永續利用的觀念，許多國家已積極尋找並發展替代能源。

Tab. 2-1 Global fossil fuel mining life

	蘊藏量	單位	開採年限
石油	1383.2	十億桶	46.2
天然氣	187.1	萬億立方米	58.6
煤炭	860,938	百萬噸	118

來源：BP Statistical Review of World Energy, June 2011

2.1.2 再生能源 (Renewable energy)

根據聯合國環境規劃署 (United Nations Environment Programme, UNEP) 對再生能源的定義：理論上能取之不盡的天然資源，並且在使用過程中不會產生新的污染物，例如太陽能 (solar power)、風能 (wind power)、地熱能 (geothermal)、潮汐能 (tidal energy) 以及生質能 (Biomass energy 或 Bioenergy)，這些都是轉化自然界的能量為能源，且可在短時間內再生。目前政府政策針對太陽能、風力和生質能皆有相關的獎勵補助措施，可見政府對再生能源的重視。

2.2 生質能 (Biomass energy)

生質能泛指利用有機物質或生物質 (Biomass) 轉換成可利用的生質能，例如酒精、柴油、氫氣或甲烷。依生質能發展的情況我們將其分成三個世代：第一代生質燃料 (First generation biofuels) 使用的是醣類、澱粉和脂質 (植物油或動物性脂肪)；第二代生質燃料 (Second generation biofuels) 使用的是非糧食作物的木質纖維素 (Lignocellulose)；第三代生質燃料 (Third generation biofuels) 則是使用藻類來產生能源 (UNEP, 2009)。

由於世界人口不斷的增加以及溫室效應所造成的氣候異常使得糧食問題逐漸浮上檯面。第一代的生質燃料是以糧食作物為料源生產生質酒精 (Bioethanol) 或生質柴油 (Biodiesel)，所以使得糧食短缺與物價上漲的情況加劇。為了避免糧食與能源間的衝突，遏止日漸嚴重的全球暖化與環境污染問題而發展出使用木質纖維素為料源來生產生質燃料，稱為第二代生質燃料。乾淨、可永續發展及高熱值 (143 kJ/g, 約為汽油的 3 倍, 天然氣的 3.5 倍)(Fan *et al.*, 2008; 葉, 2011) 並於燃燒時只產生水的燃料—氫氣 (hydrogen)。

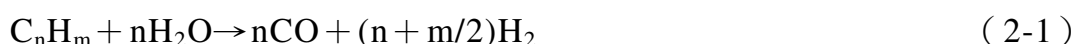
2.3 氫氣的產生方式

產氫的方法主要可以分成三大類，熱化學法、電化學法及生物方法，如 Tab. 2-2 所示。

2.3.1 熱化學法 (Yürüm, 1994; 葉, 2011; 羅, 2005)

2.3.1.1 蒸氣重組法

以高溫水蒸氣 (650-700°C) 與低碳的天然氣 (一般使用甲烷) 反應產生氫氣與二氧化碳，其反應式如下：



2.3.1.2 煤炭氣化反應

將燃燒的煤炭或有機物質通以蒸氣和空氣後，加熱至 1200-1800 °C 即產生水煤氣反應產生氫氣與一氧化碳。

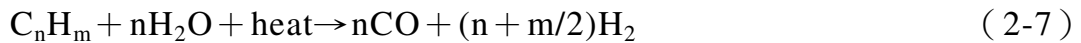
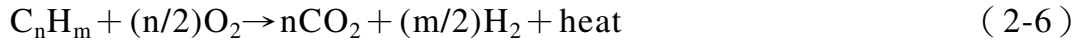


Tab. 2-2 Hydrogen production method (Yürüm, 1994 ; 林 , 2002)

主要的方法	程序		原料
熱化學法 (Thermochemical method)	蒸氣重組法 (Steam Reformation)		天然氣 (Natural gas)
	煤炭氣化反應 (Coal Gasification)		煤炭 (coal)
	部分氧化法 (Partial oxidation)		碳氫化合物 (heavy oil)
電化學法 (Electrochemical method)	電解法 (Electrolysis)		水 (H ₂ O)
	光電解法 (Photoelectrolysis)		水 (H ₂ O)
生物法 (Biological method)	光合作用 (Photosynthesis)	直接光解作用 (Direct photosynthesis)	水 (H ₂ O)
		間接光解作用 (Indirect photosynthesis)	水 (H ₂ O) 有機物質 (organism)
	醱酵作用 (Fermentation)	光醱酵 (Photofermentation)	有機物質 (organism)
		暗醱酵 (Darkfermentation)	有機物質 (organism)

2.3.1.3 部分氧化法

將碳氫化合物在缺氧的狀況下進行燃燒，即產生氧氣、一氧化碳和二氧化碳，其反應式如下：



2.3.2 電化學法 (林, 2002)

2.3.2.1 電解法

以直流電電解水 (通常加入鹼性物質如氫氧化鉀為電解液)，即可分別在陰極與陽極收集到高純度的氫氣與氧氣。

2.3.2.2 光電解法

利用光觸媒 (如半導體材料) 吸收光能將水分解為氫氣及氧氣，然而光觸媒的穩定性欠佳，仍是有待克服的問題。

2.3.3 生物法

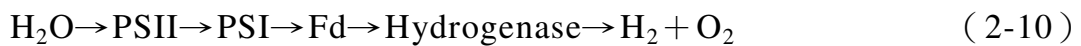
由表 2-2 中提到生物法產氫可分成光合作用及醱酵作用二種。光合作用的產氫方式是透過綠藻或藍綠藻藉由光能將水光解後產生氫氣，而醱酵作用則是以有機物質作為電子提供者，由需要光源的光合細菌或不需要光源的厭氧菌進行醱酵作用，使得有機物分解後產生之電子經特定的電子傳遞系統將電子傳給水中的質子 (H^+) 而產生氫氣，各類產氫為生物及產氫方法之優、缺點如 Tab. 2-3 所示。

2.3.3.1 光合作用 (Das and Veziroglu, 2008; 趙, 2004; 羅, 2005; 葉, 2011)

2.3.3.1.1 直接光解作用

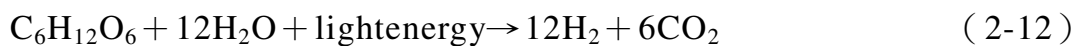
綠藻依下列 2-9 和 2-10 的反應式將太陽所提供的光能轉變成化學

能，由水產生氫氣。綠藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 在厭氧情況下，可產生氫氣或利用氫氣作為電子提供者。氫氣合成的反應是利用產生的電子經兩個光系統 (photosystem II, PSII 和 photosystem I, PSI) 透過還原態的硫鐵蛋白 (ferredoxin, Fd) 傳給 hydrogenase 而產生氫氣，反應如 2-10 所示。



2.3.3.1.2 間接光解作用

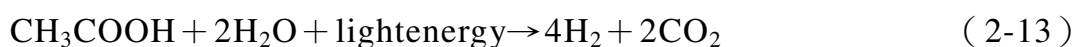
藍綠細菌 (*Cyanobacteria*) 透過以下反應式來產生氫氣。首先將水分解產生氧氣，並將二氧化碳固定成細胞的物質儲存。第二階段則是利用先前細胞物質所儲存的電子傳遞給質子而產生氫氣。在此系統中，光合作用和固氮作用交互作用。



2.3.3.2 醱酵作用

2.3.3.2.1 光醱酵 (Das and Veziroglu, 2008; 趙, 2004; 郝, 2002)

這類的醱酵反應是由光合異營性的微生物，如紫色不含硫菌在缺乏氮氣的情況下，利用有機物 (有機酸) 和光能藉著 nitrogenase 的作用而產生氫氣，反應式如 2-13 所示。



Tab. 2-3 Comparison of advantages and disadvantages from different biohydrogen production method (Das and Veziroglu, 2001 ; Nath and Das, 2004 ; Das and Veziroglu, 2008)

Process	Type of microorganisms	Advantages	Disadvantages
Direct biophotolysis	Green algae <i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlamydomonas moewusii</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Can produce H₂ directly from water and sunlight ▶ Solar conversion energy increased by 10 folds as compared to trees, crops 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Requires light for hydrogen production ▶ O₂ can be dangerous for the system
Indirect biophotolysis	Cyanobacteria Heterocystous <i>Anabaena variabilis</i> <i>Anabaena cylindrica</i> Nonheterocystous <i>Plectonema boryanum</i> <i>Mastidocladus laminosus</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Can produce H₂ from water ▶ Nitrogenase enzyme mainly produces hydrogen ▶ Has the ability to fix N₂ from the atmosphere 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Require sun light ▶ About 30% O₂ present in the gas mixture with H₂ ▶ O₂ has inhibitory effect on nitrogenase
Photo-fermentation	Photosynthetic bacteria <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Thiocapsa roseopersicina</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Can use different waste materials (whey, distillery effluents, etc.) ▶ Can use wide spectrum of light 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Require light for the H₂ production ▶ Light conversion efficiency is very low ▶ O₂ is a strong inhibitor of hydrogenase ▶ Fermented broth causes water pollution
Dark-fermentation	Fermentation bacteria <i>Enerobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium pasteurianum</i> <i>Bacillus coagulans</i> <i>Citrobacter intermedius</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Can produce hydrogen without light ▶ A variety of carbon sources can be used as substrates ▶ It produces valuable metabolites ▶ Anaerobic process, no O₂ limitation problem 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Relatively lower achievable yields of H₂ ▶ As yields increase H₂ fermentation become thermodynamically unfavorable ▶ Product gas mixture contains CO₂ which has to be separated

在紫色不含硫菌的產氫機制方面，與產氫代謝相關的酵素為 nitrogenase 和 hydrogenase，nitrogenase 是主要的產氫酵素，而 hydrogenase 主要為耗氫反應，但視環境中氫分壓高低而論。因氫分壓過大或還原能不足時，hydrogenase 可吸收氫氣，提供電子進入光和電子傳遞鏈以獲取還原能。

2.3.3.2.2 暗醱酵

在傳統厭氧消化處理過程中，微生物將有機物質經水解 (Hydrolysis)、酸化 (Acidogenesis)、乙酸化 (Acetogenesis) 後進入甲烷化 (Methanogenesis)，因醋酸菌及甲烷生成菌會消耗氫氣，所以氫氣在甲烷化的代謝路徑中僅為中間產物 (Fig. 2-1)。在傳統的厭氧消化過程中，氫氣的累積濃度通常十分低，需藉由熱篩或酸處理的方式去除耗氫菌，提升生物氣體中氫氣的濃度。

與光醱酵產氫程序比較，暗醱酵產氫程序有許多的優點如 Tab. 2-3 所談及之：(1) 不受限於光照 (2) 可利用多種類的基質做為碳源 (3) 可產生許多具價值性的代謝產物。

綜觀以上產氫方式，熱化學法雖早已工業化，但在製程中卻需要消耗大量的能源，且在過程中會同時產生污染，足以破壞環境，因此不適合永續利用。雖然電化學法不會產生污染且製得的氫氣純度較高，但電化學法有耗能高、效率低及電極穩定性欠佳等問題，所以在應用上並不符合能源經濟。反觀生物法產氫較為乾淨且節省能源。

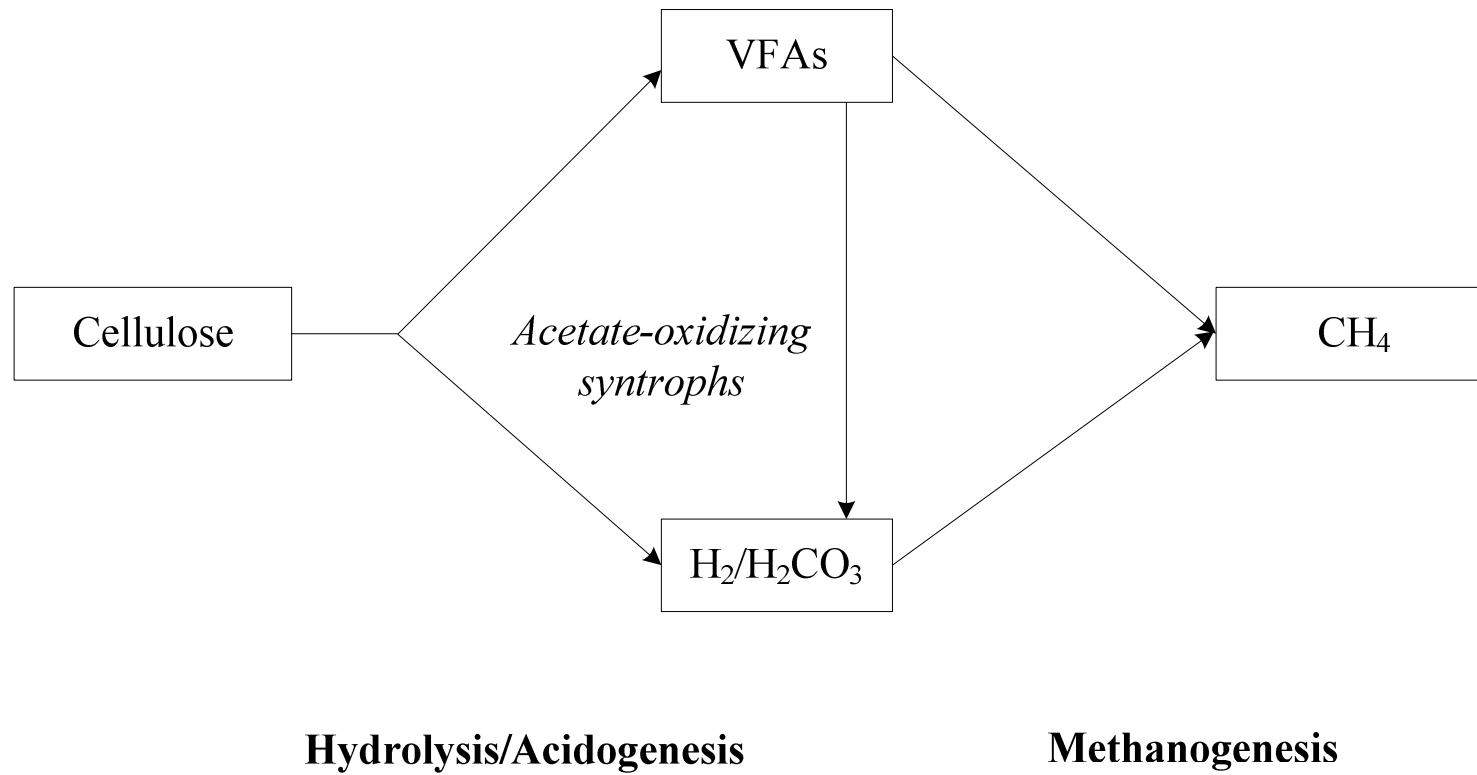


Fig. 2-1 Schematic diagram of anaerobic cellulose degradation (Qu *et al.*, 2009).

2.4 厭氧纖維水解醱酵產氫

2.4.1 基質

在進行厭氧醱酵產氫時，可利用多元的有機物質作為碳源。即使葡萄糖是最容易被利用的基質，但為了能永續發展需轉而利用木質纖維素。木質纖維素是植物細胞壁中的主要成分，它是纖維素（Cellulose）、半纖維素（Hemicellulose）和木質素（Lignin）的統稱，其排列的方式如 Fig. 2-2 所示。如 Tab. 2-4 所提及，各植物以纖維素的含量為最多約有 38-50% 左右，其次為半纖維素（23-32%），含量最少的則是木質素只有 15-25%，不過依植物種類不同而有所區別。因此纖維素可說是地球上含量最豐富的聚合物。

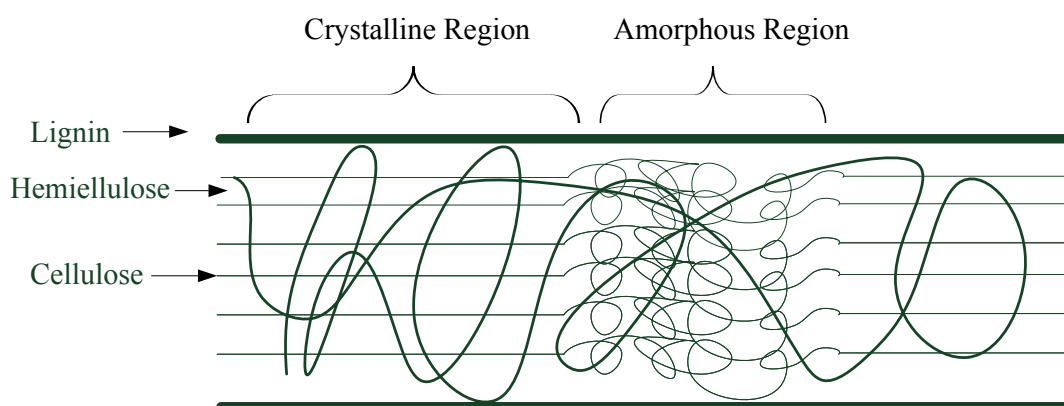


Fig. 2-2 Composition of lignocellulose (Saratale *et al.*, 2008) .

Tab. 2-4 Comparison of cell wass compositions in different plant biomass (Saha, 2003 ; Saratale *et al.*, 2008)

	Composition (% , dry basis)		
	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Hardwoods stems	40-55	24-40	18-25
Softwood stems	45-50	25-35	15-35
Corn cob	45	35	15
Corn stover	40	25	17
Rice bran	35	25	17
Rice straw	35	25	12
Wheat straw	30	50	20
Sugarcane bagasse	40	24	25
Switchgrass	45	30	12
Coastal bermuda grass	25	35	6

2.4.1.1 纖維素的結構

纖維素是由大量的葡萄糖單體所聚合而成的多醣體，每個分子平均由 10,000 以上的單體所組成，並以 β -1,4 糖苷鍵鍵結而成的長鏈聚合物，其構造如 Fig. 2-3 (a) 所示。長鏈間以氫鍵形成束狀纖維，部分纖維整齊排列，利用顯微鏡觀察的結果為結晶型結構，稱為結晶區 (Crystalline region)；而部分排列較為鬆散呈現不規則狀的稱為非結晶區 (Amorphous region)，如 Fig. 2-2 和 Fig. 2-3 (b)。

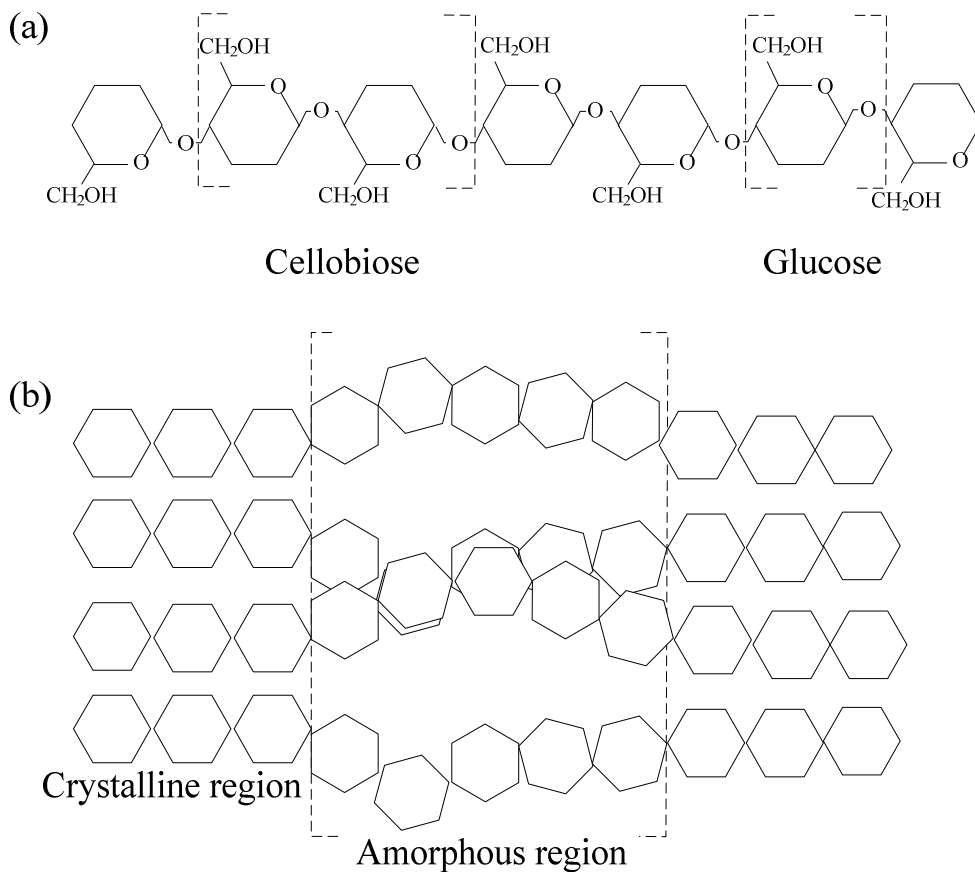


Fig. 2-3 Cellulose structure diagram. (a) Scheme of the primary structure of cellulose (b) Scheme of the structure of a cellulose fibril (Askarieh *et al.*, 2000 ; Desvaux, 2005)

2.4.2 纖維水解產氫菌群來源

由於纖維素普遍存在於大自然中，雖然其結構穩定不易被生物降解，但依然有不少微生物（如，細菌、放射菌或真菌）具有纖維水解酵素系統。

好氧的纖維水解生物常在土壤表層被發現，而在厭氧環境下纖維水解生物常見於動物的消化道、底泥、堆肥或是廢水處理廠的厭氧消化污泥槽中。對草食性動物而言，腸胃道中的纖維水解酵素扮演了相當重要的角色，因為它們將固態的纖維素轉化成可以吸收的醣類。Tab. 2-5 歸納了目前已被學者利用來進行纖維水解產氫的動物腸胃道菌群及其成果。因此可見之從動物腸胃道取得具纖維水解產氫效能之菌群是可行的。

本研究所使用的菌種來自南美洲的陸生蜥蜴—綠鬣蜥之糞便。綠鬣蜥是草食性蜥蜴，牠可利用腸胃道內的微生物醱酵系統分解植物中的纖維物質以獲取能量與養份。綠鬣蜥降解半纖維素及纖維素的能力與哺乳動物相近，即食用相同木質化程度之食物，綠鬣蜥可分解其中 54% 木質纖維，而具有瘤胃的哺乳類動物則可降解 60%。由以上幾點可之利用綠鬣蜥之腸道菌群進行纖維水解是可行的（Katherine, 1984）。

2.4.3 纖維水解機制

水解（hydrolysis）係指將化學物質中的氫氧原子鍵結加入水分子的方式進行裂解。而纖維素的水解是將兩葡萄糖單體間的 β -1,4 糖苷鍵破壞，使兩端分別形成 OH 基如 Fig. 2-4 所示。

Tab. 2-5 Different seed source for H₂ fermentation

Microbial source	Substrate	H ₂ production yield	Reference
Cow dung compost	wheat straw wastes	68.1 ml H ₂ /g TVS	Fan <i>et al.</i> , 2006a
Panda manure	corn stalk (15g/L)	176 ml H ₂ /g-TS	Fan <i>et al.</i> , 2008
Elephant dung	total sugar (11.28 g/L)	0.84 mol H ₂ /mol total sugar	Fangkum and Reungsang, 2011
Cow manure	xylose (5.79 g/L)	0.56 mol/mol monosaccharide	Yokoyama <i>et al.</i> , 2007
Cow manure	cellobiose (6.60 g/L)	2.68 mol/mol monosaccharide	Yokoyama <i>et al.</i> , 2007
Cow manure	glucose (6.25 g/L)	2.65 mol/mol monosaccharide	Yokoyama <i>et al.</i> , 2007
Cow manure	lactose (6.95 g/L)	2.17 mol/mol monosaccharide	Yokoyama <i>et al.</i> , 2007
Cow manure	soluble starch (6.25 g/L)	1.73 mol/mol monosaccharide	Yokoyama <i>et al.</i> , 2007
Liquid swine manure	glucose (10 g/L)	1.63 mol-H ₂ /mol glucose	Wu <i>et al.</i> , 2009

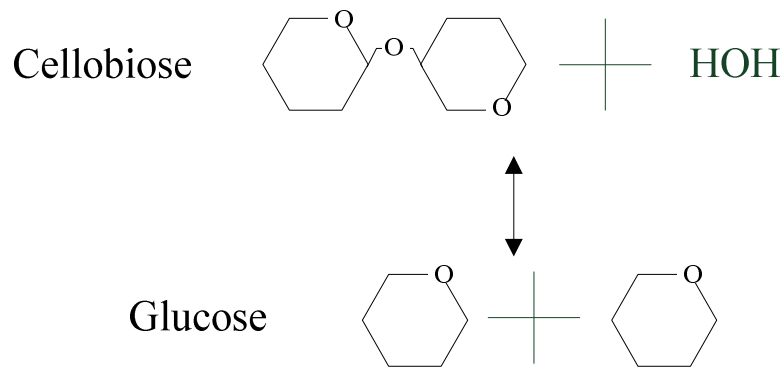


Fig. 2-4 Cellobiose hydrolysis into two glucose molecules.

纖維水解酵素依作用位置區分成三種類型：

1. 內切型葡萄糖酶 (Endo- β -1,4-D glucanase)：

此類型酵素能從纖維素長鏈任一位置打斷纖維素，但只針對非結晶型區的長鏈有作用。

2. 外切型葡萄糖酶 (Exo- β -1,4-D glucanase)：

作用在纖維素的尾端，可區分為作用於還原端或非還原端，同時此酵素可破壞結晶型的纖維素。

3. β -葡萄糖苷酶 (β -1,4-D-glucosidase)：

主要是將纖維水解後的產物，如纖維雙糖或寡糖水解成葡萄糖單體，由於此酵素在各種纖維水解菌或是非纖維水解菌中普遍存在，因此本酵素並不能做為纖維水解能力的依據。

如 Fig. 2-5 纖維水解菌以纖維素為基質時，會先將纖維素轉變成可溶性的多醣 (Polysaccharide) 再轉化成寡糖 (Oligosaccharide) 最後才分解成單醣 (Monosaccharide)，同時藉由主動運輸或擴散作用進入細胞。

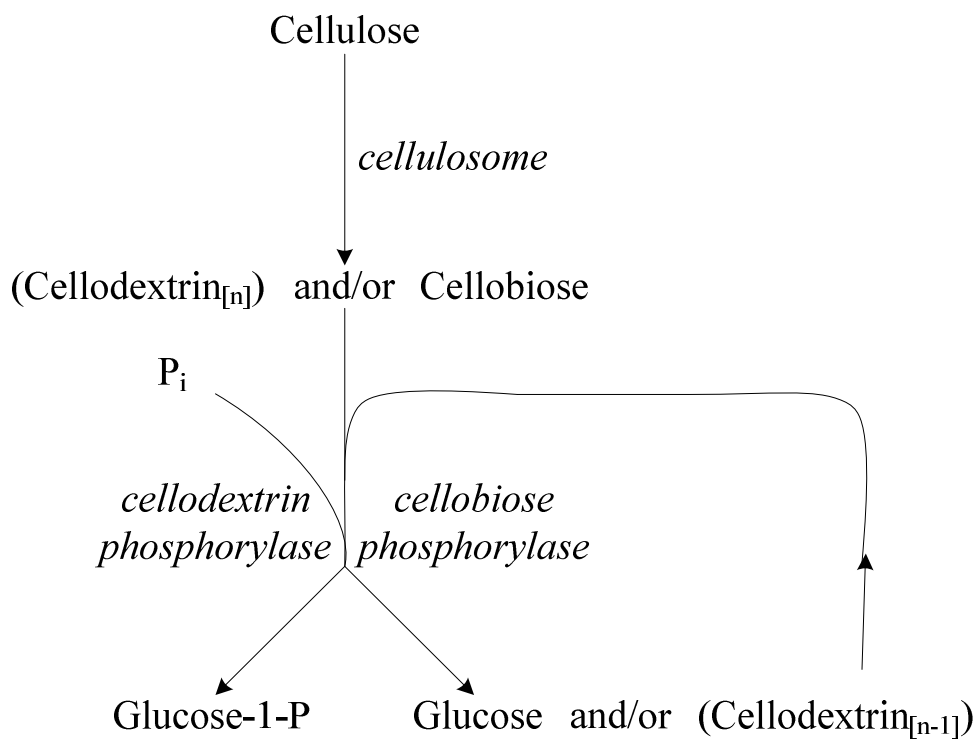
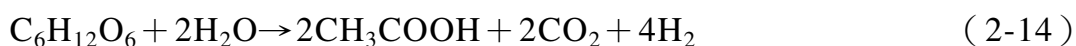


Fig. 2-5 Conversion of cellulose into fermentation product glucose by an engineered strain of *Clostridium cellulolyticum* (strain CC-pMG8). (Guedon *et al.*, 2002) .

2.4.4 暗醱酵產氫機制

以葡萄糖為基質進行厭氧醱酵產氫時，當代謝產物為乙酸，理論上每莫耳的葡萄糖會產生 4 莫耳的氫氣；當代謝產物為丁酸時每莫耳的葡萄糖只產生 2 莫耳的氫氣，其反應式如 2-14 和 2-15。Fig. 2-6 為葡萄糖進行醱酵時，氫氣生成的機制圖，氫氣可由三個機制獲得：(1) 葡萄糖藉由糖解作用轉化成丙酮酸 (pyruvate) 時會產生 NADH，經 hydrogenase 及 ferredoxin (Fd) 的作用使 NADH 轉變回 NAD^+ 時產生氫氣；(2) 丙酮酸轉變為 acetyl-CoA 時藉由 hydrogenase 和 ferredoxin 的作用產生氫氣，同時此步驟會有甲酸及二氧化碳的形成；(3) 同樣地，甲酸亦可直接轉化成氫氣和二氧化碳。



葡萄糖在轉化為丙酮酸的過程中會釋放出高能量及帶電子的 NADH，此時 NADH 可被轉化成能量提供細胞的生長與活動。但 NADH 在不同的代謝過程中可能又被利用轉化為 NAD^+ ，剩餘的 NADH 才能被 hydrogenase 及 ferredoxin 轉變為 NAD^+ 釋出氫氣。其中代謝產物為乙酸時較有利於 NADH 的生成，Fig. 2-7 的代謝路徑圖說明了代謝產物為乙酸時有較多的 NADH，因此較有利於氫氣生成。

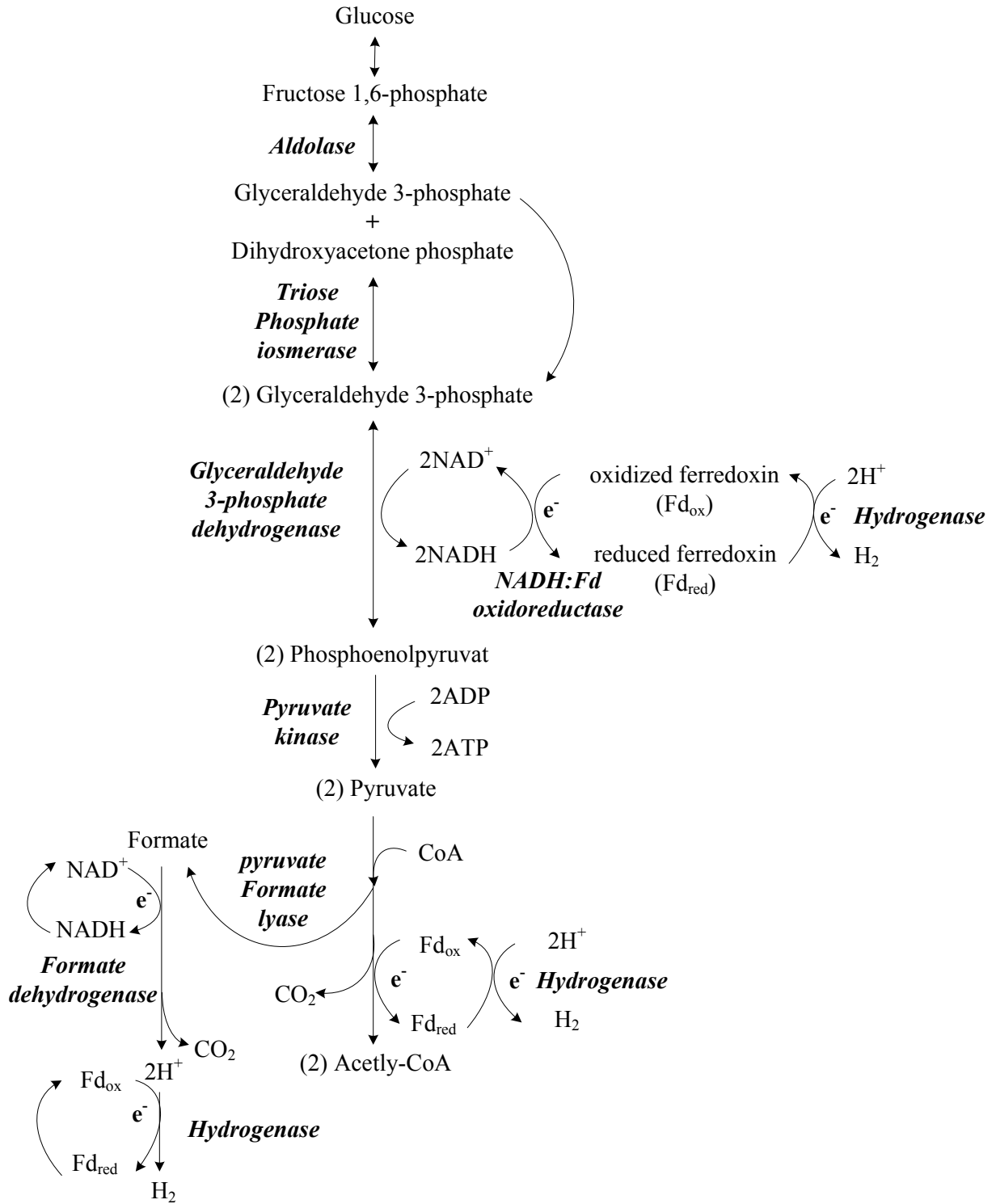


Fig. 2-6 Hydrogen fermentation from glucose (Peters, 1999 ; Kalia, *et al.*, 2003 ; Hallenbeck, 2009) .

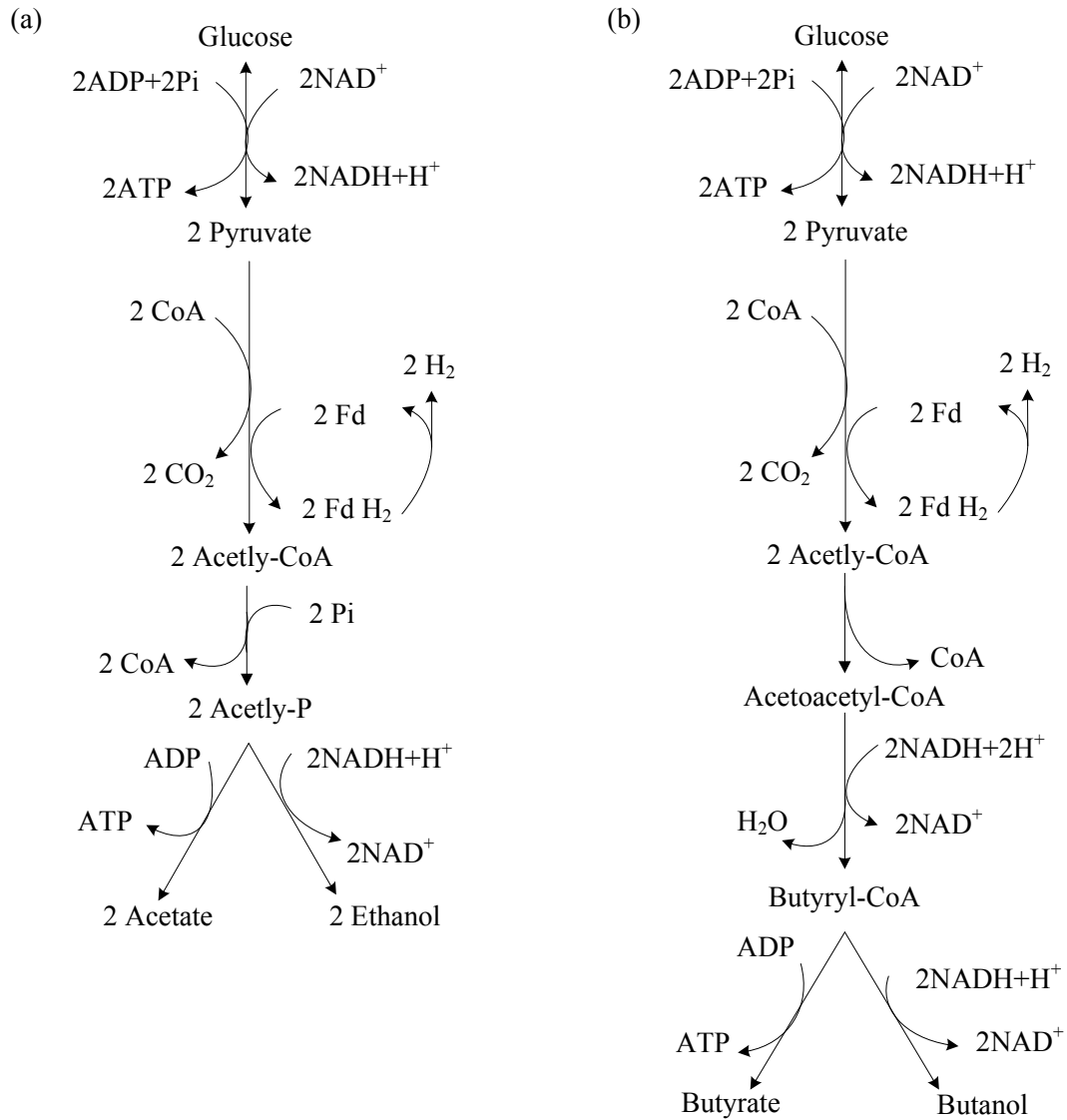


Fig. 2-7 Generation of hydrogen with simultaneous production of acetate (a) and butyrate (b) via glycolysis. Extra molecular hydrogen can be generated in the case of acetate production by NADH that is generated during glycolysis (Ntaikou *et al.*, 2010 ; Sillers *et al.*, 2008) °

2.4.5 暗醱產氫程序影響因子

若要成功地培養微生物，適當的化學及物理條件是必須的。化學條件一般指的是培養基中所含的營養物質；而物理條件則是指影響微生物生長的外在環境。不同的微生物對各種環境因素皆有不同的需求，唯有在適合的條件下才能順利繁殖並生產目標產物。

2.4.5.1 溫度

生物的生長過程仰賴體內的化學反應，而當中反應速率則受到了溫度的影響。細菌同樣也受到溫度的作用，進而影響菌體的生長速率及代謝作用。總而言之，所有生物皆須生長在適合的溫度範圍內。

對每種細菌而言，在最適生長溫度時，繁殖最快、酵素的作用也發揮到極致。反之，若在過低或過高的溫度下，細菌的生長及繁殖等活動會有明顯下降的情況。

根據 Wang 和 Wan (2008a) 的研究指出將溫度從 20°C 升溫至 35°C 時有助於乙酸及乙醇的生成及累積，但若將溫度提升至 55°C 時乙酸及乙醇的濃度反而下降了。此結果證明溫度的轉變會使微生物的代謝路徑發生變化，更說明了溫度在細菌的生長及代謝路徑上是個相當重要的影響因子。

2.4.5.2 pH 值

大多數的細菌都偏好生長在 pH 值約為 7 的中性環境下，只有極少數的微生物可生長在極酸或極鹼的環境中。因此有嗜酸菌、嗜中性菌和嗜鹼菌的分別。

在厭氧產氫的程序中，由於大量的酸生成使得環境中的 pH 值下降。低 pH 值不僅會降低 hydrogenase 的活性，更有可能改變微生物的代謝途徑。甚至在極端的環境下，會直接殺死微生物。以混合菌群進行生物產氫時，由於每種微生物對於環境的需求不同，當環境中的

pH 值發生變化時，雖不致於對系統穩定性造成明顯影響，但依然有研究報告指出 pH 值對 ferredoxin 而言是個重要的影響因子，與 NAD^+ 或 H^+ 轉變為 NADH 或氫氣有密切的關係 (Dinamarca and Bakke, 2011)。所以，尋找適當的 pH 值仍是必要的。

2.4.5.3 鐵、鎳離子

在厭氧生物產氫反應中，產氫酵素 (hydrogenase) 是重要的酵素之一。厭氧產氫菌利用 hydrogenase 和 ferredoxin 等酵素系統的作用，將細胞內氧化有機物所產生的多餘電子經由此酵素系統轉移給氫離子形成氫氣而排出細胞外，減少細胞內多餘的電子以維持細胞內 H^+ 的恆定 (Adams *et al.*, 1980)。

Hydrogenase 一般藉由其金屬輔因子做為區分，金屬輔因子作用於氫活性反應及電子的傳遞，一般分別為 [Ni-Fe]hydrogenase 和 [Fe-Fe]hydrogenase 兩種 (Frey, 2002)。其中以 [Ni-Fe]hydrogenase 較為廣泛的存在於微生物中，而只有少數的微生物擁有 [Fe-Fe]hydrogenase。

Peguin 和 Soucaille (1995) 提出，當環境中缺乏鐵離子時，細胞內的 hydrogenase 的活性會降低，且鐵離子的濃度低於 $25 \mu\text{mol/L}$ 時，*Clstridium acetobutylicum* 的生長會受到限制。Junelles *et al.* (1988) 當鐵離子的濃度低於 $0.7 \mu\text{mol/L}$ 時，*C. acetobutylicum* 的 hydrogenase 的活性會下降。Schoenheit *et al.* (1979) 也曾指出當環境中的鐵離子濃度低於 $10 \mu\text{mol/L}$ 時 *C. pasteurianum* 的生長是受到限制的。由以上的文獻得知，微生物對於鐵離子濃度的需求雖有不同，但鐵離子的存在卻是必需的。在混合菌群的系統中，當鐵離子濃度低於 3.15mmol/L 時，產氫速率會隨著鐵離子的濃度增加而有逐漸升高的趨勢，而最大產氫量也有相同趨勢 (Lee, 2001)。

Wang 和 Wan (2008c) 指出當環境中有鎳離子存在時，累積產氫

量確實會受到影響，當鎳離子的濃度為 0.1 mg/L 時氫氣的產量以及氫氣產率確實是有提升的，但濃度高於 0.1 mg/L 時便會使氫氣產量及產率逐漸下降。因此適當的鎳離子濃度能夠提高氫氣的產量，但過高的濃度反而會造成抑制導致氫氣的產量及產率降低。由此可知，鐵離子以及鎳離子對於氫氣的產量是有影響的。因此有許多的研究是利用鐵離子或鎳離子來激活此兩種類型的 hydrogenase 以達到提高氫氣產量的目的 (Karadag, 2010)。

2.5 實驗設計方法

傳統上大多以「一次實驗決定一個因子最適值」(One-factor at a time) 的方法來尋找最適點。但此方式往往未考慮因子與因子間的交互關聯效應 (Interactive effect)，即使在考慮此一效應下，所需的實驗次數也較多，因此才發展出實驗設計。實驗設計是一個組織化、結構化的方法來確定一個實驗的影響因子，對於實驗結果產生的影響關係。實驗設計方法相當廣泛，最常被使用的方法為因子設計 (Factorial design)、田口方法 (Taguchi design) 以及反應曲面法 (Response surface methodology)。

2.5.1 因子設計

因子設計又分成了部分因子設計 (Fractional factorial design) 及全因子設計 (Full factorial design)。若實驗設計是考慮所有可能的因子水準組合，則此設計就稱為全因子設計。若實驗設計本身由於成本或其他原因的限制，只考慮一完整實驗的其中一部分進行實驗稱為部分因子設計。

對於 n 個因子，每個因子可設定 2 個水準，一個為「高」(+) 和另一個為「低」(-) 的設定，這樣的設定稱為 2^n 設計也就是二水準因子設計 (two-level factorial design)，如 Tab. 2-6 所示 (許, 2009)。

Tab. 2-6 2^3 factorial design (Box and Behenken, 1960)

NO.	X_1	X_2	X_3	Y
1	-1	-1	-1	Y_1
2	1	-1	-1	Y_2
3	-1	1	-1	Y_3
4	1	1	-1	Y_4
5	-1	-1	1	Y_5
6	1	-1	1	Y_6
7	-1	1	1	Y_7
8	1	1	1	Y_8

2.5.2 田口設計

田口設計經由直交表排列來配置實驗，主要是降低變異原因的影響，而不是去除變異原因來改善品質。其最大的特點在於以較少的實驗組合，便能找到實驗結果變異小的設計方法，而達到最佳化的效果。並且以少數實驗便能判斷出最佳化的趨勢，其可行性遠大於全因子設計方法。

田口直交表以 $L_a(b^c)$ 表示，a 表是實驗之次數，b 代表因子的水準數，c 是因子數，L 取自拉丁方格法的第一個英文字母。 $L_9(3^4)$ 直交表（如 Tab. 2-7）代表共有 9 組實驗，其中有 3 個水準和 4 個因子，但此因子以全因子實驗設計必須進行 81 次實驗，因此田口設計較全因子設計簡便（潘，2011）。

2.5.3 反應曲面法 (Wang and Wan, 2009；葉，2011)

藉由二水準因子設計找出粗略的極值點所在區域後，再進一步的確定極值點的位置，一般使用二階模式如方程式 2-16：

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j \quad (2-16)$$

其中 Y 為反應變數，X 為自變數，能更詳細的描述極值點之作標及立

體曲面之變化，依此模式尋找極值點座標。

Tab. 2-7 Plan for L_9 Taguchi design (3^4)

NO.	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

反應曲面的實驗設計又可分成中心混成設計 (Central composite design) 及 Box-Behnken 設計。中心混成設計包含了三種實驗方式：(1) 角點實驗又稱二水準因子設計 (2^n 全因子設計)、(2) 軸點實驗 ($2 \times n$) 和 (3) 中心點實驗。軸點為原點由中心軸向外延伸，在適當距離(設計點與原點之間的距離)所設下的實驗點。而中心的實驗一般而言，重複實驗次數取 3-6 之間。而 Box-Behnken 設計除了二水準因子設計之外還包括了不完全區的設計(incomplete block design)，如 Fig. 2-8 所示。

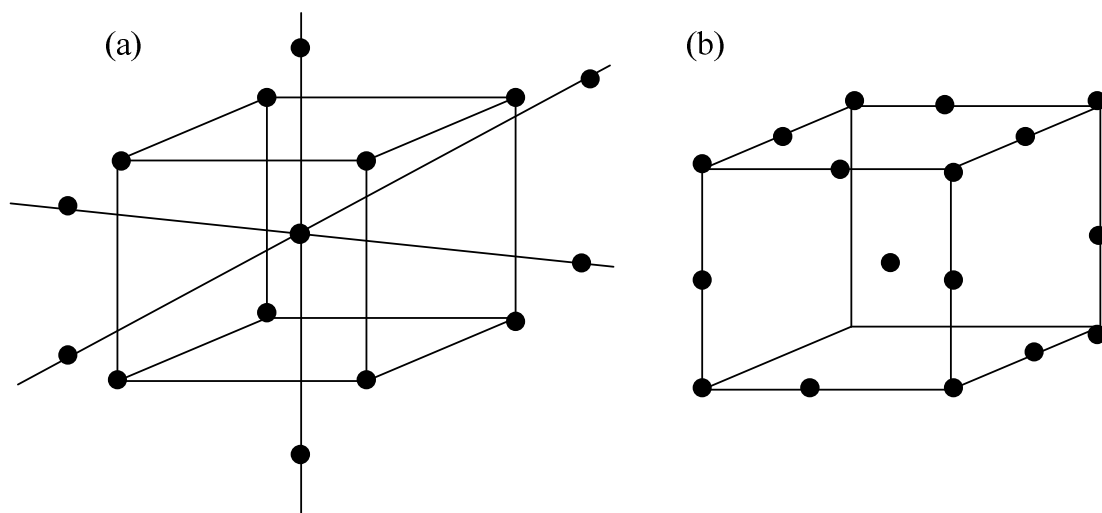


Fig. 2-8 Design or response surface methodology (a) Central composite design
(b) Box-Behnken.

2.5.3.1 實驗設計流程

經由 Box 研究群及其他學者們多年的研究，反應曲面法至今已發展地相當完備。將最適化的步驟歸納為下列五項及 Fig. 2-9：

- (1) 極值點區域的逼近：利用二水準因子設計及陡升路徑法找 (Method of steepest ascent) 尋極值點區域。
- (2) 反應曲面數學模式的建立：以多元迴歸 (Multiple regression) 進行二階模式的數學契合。
- (3) 模式適切性檢驗：以統計檢定方法證明此數學模式在實驗數據描述上的適切性。
- (4) 極值點之決定：確定模式後，可藉由求極值的數學理論決定極值點位置與計算出的最適回應值。
- (5) 因子影響效應之分析：因子之間的交互關聯性亦可藉由此數學模式進行分析，並進一步以實驗證明極值點的可靠度。

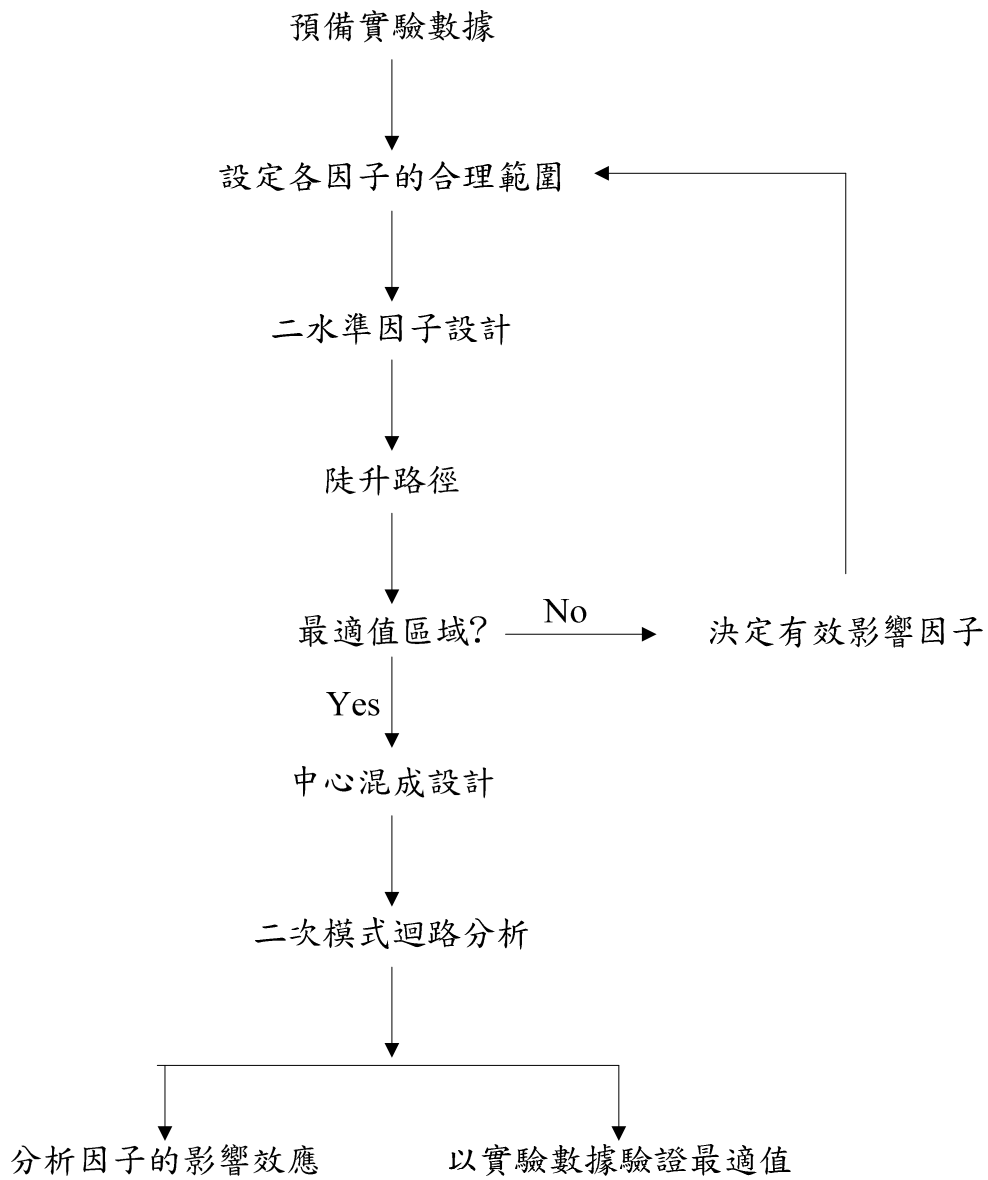


Fig. 2-9 Flowchart of experimental design (葉，2011)

第三章 材料與方法

3.1 實驗設計流程

本研究是利用綠鬣蜥 (*Iguana iguana*) 腸道菌群做為纖維水解產氫的植種來源，利用 α -cellulose 為基質。測驗其對環境及替代能源供應是否具有貢獻之能力，並利用反應曲面法 (RSM) 探討最佳產氫速率之培養條件，包含溫度、初始 pH 以及亞鐵離子濃度之測驗，其實驗設計流程如 Fig. 3-1 所示。

3.2 菌株來源

本研究所使用的菌種來自南美洲的陸生蜥蜴—綠鬣蜥之糞便。綠鬣蜥是草食性蜥蜴，牠可利用腸胃道內的微生物醱酵系統分解植物中的纖維物質以獲取能量與養份。綠鬣蜥降解半纖維素及纖維素的能力與哺乳動物相近，即食用相同木質化程度之食物，綠鬣蜥可分解其中 54% 木質纖維，而具有瘤胃的哺乳類動物則可降解 60%。並且經預實驗的研究結果發現，本菌群在六天內可完全降解 5 g/L 的纖維濾紙 (Whatman NO.1) 並產生氫氣。

3.3 菌株培養

3.3.1 厭氧操作

本研究利用 Hungate 厭氧操作技術 (Hungate, 1969) 以維持培養基及實驗過程的絕對厭氧，主要的操作設施如 Fig. 3-2 所示。厭氧加氣站所使用的氣體鋼瓶主要分為三種—氮氣、氫氣以及混合氣 (20% CO₂ + 80% N₂)。搭配銅絲和加熱包並以銅管、高氣密性之軟管與鋼針連接，以供應配製培養基或植種過程所需之氣體。

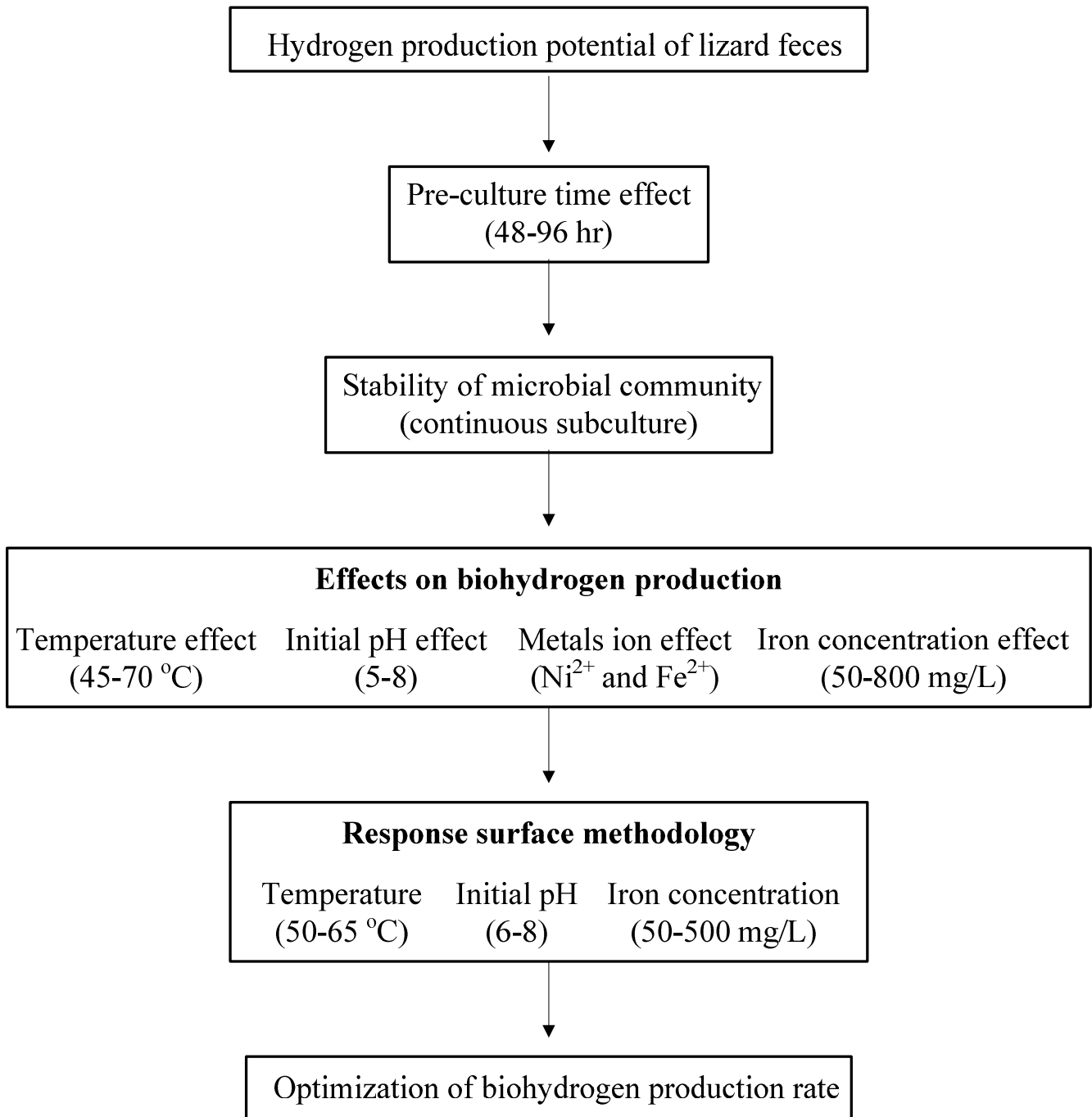


Fig. 3-1 Schematic flowchart of experimental design.

使用本設備前必須先將加熱包升溫至 200-250°C 後通入氫氣，使

氫氣與 CuO 反應將銅絲還原（經還原的銅絲將呈現亮銅色），還原的銅絲可捕捉氣體鋼瓶及設備中微量的氧氣形成 CuO，使氣體呈現無氧狀態，提供配製培養基或植種過程時所需的絕對厭氧（Strictly anaerobic）環境。

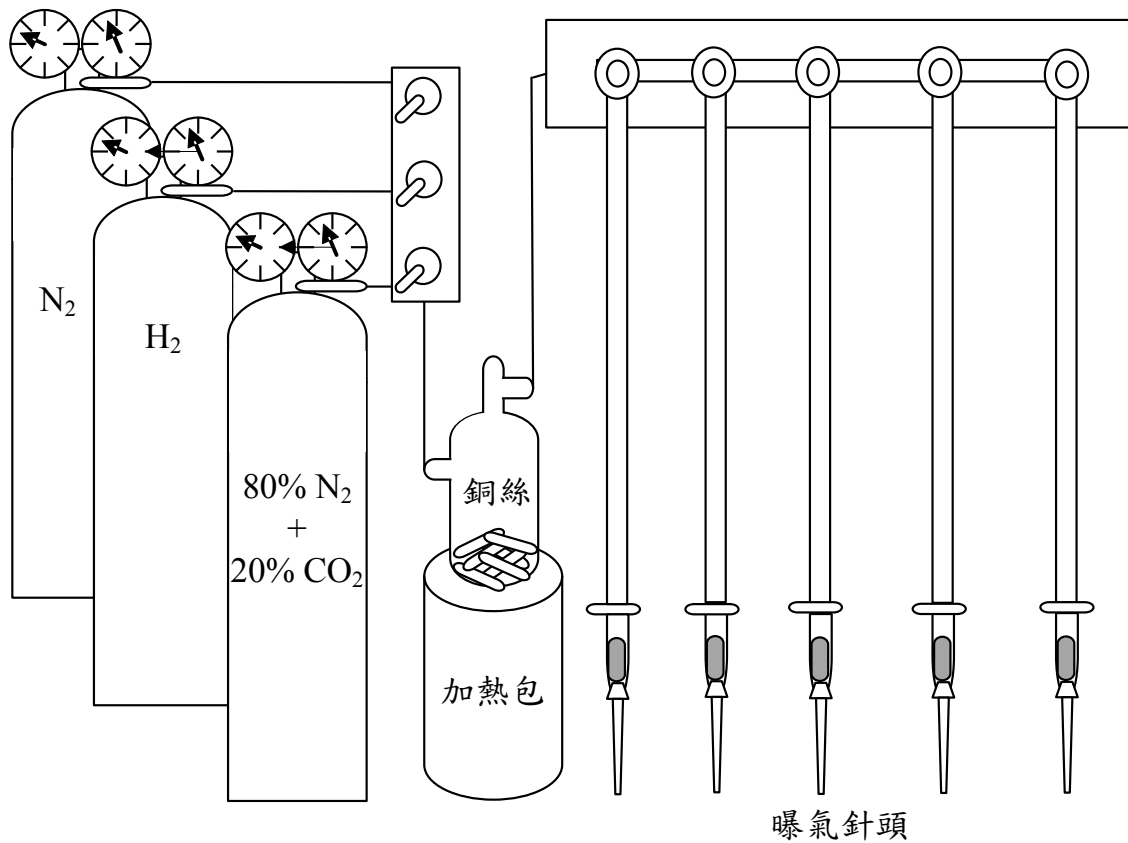


Fig. 3-2 Schematic diagram of Hungate gas station.

3.3.2 嗜熱厭氧培養基 (Thermophilic anaerobic medium, TA medium)

本研究所使用的培養基為嗜熱厭氧培養基，其成分如 Tab. 3-1 至 Tab. 3-3 所示 (Huang *et al.*, 1988)。配製培養基時曝以氮氣並將 Tab. 3-1 的無機鹽類、氧氣指示劑 resazurin 與微量元素 (Tab. 3-2) 以去離子水定量後煮沸，以降低培養基內的溶氧。待培養基冷卻至 60°C 後將氣體改為混合氣 (20% CO₂ + 80% N₂) 並加入培養基還原劑 L-Cysteine hydrochloride 以及提供培養基鹼度的 NaHCO₃。最後待培養基冷卻至室溫並呈現透明無色後，便可分裝至已裝入纖維素之厭氧血清瓶中，以 n-butyl stopper 與鋁蓋封住瓶口，使厭氧血清瓶呈密閉狀態，並以滅菌釜 (Autoclave) 在 121°C 下滅菌 15 分鐘。經滅菌後之培養基於植種前加入還原劑 Na₂S，以避免培養基中含有氧氣。並依序加入 Vitamin solution (Tab. 3-3) 及 yeast extract，最後再植入 10% 體積之菌液，置於 55°C 恆溫箱內震盪培養。

3.4 植種品質

Neves *et al.* (2001) 針對植種品質提出了幾個觀點：(1) 植種來源必須具有活性且健康的狀態方可縮短次代培養時的遲滯期、(2) 植種來源必須要有足夠的體積，足以提供新鮮培養基需要的量 (約 3-10% 的植種量)、(3) 若植種來源為純菌時，必須是無污染的、(4) 植種來源必須保有產生產物的能力。因此植種來源的品質於後續研究是相當重要的一項因子。

3.4.1 前培養時間

將植種來源及 TA 培養基於厭氧操作台中充分混合後，分裝成 5 瓶並置於 55°C 下分別培養 48、60、72、84 和 96 小時後做為新鮮培養基的植種來源。

Tab. 3-1 Basal composition of thermophilic anaerobic medium

Component	Final concentration (L ⁻¹)
CaCl ₂	0.05 g
MgCl ₂	0.10 g
(NH ₄)Cl	1.00 g
K ₂ HPO ₄	0.40 g
Resazurin	0.5 mg
Trace element solution ^a	see Tab. 3-2
L-Cysteine hydrochloride*	0.5 g
NaHCO ₃ *	4.0 g
Na ₂ S**	0.25 g
Vitamin solution ^{b**}	see Tab. 3-3
Yeast extract**	1.00 g

^a Trace element solution 成分如 Tab. 3-2

^b Vitamin solution 成分如 Tab. 3-3

* 培養基經煮沸，待冷卻後加入

** 培養基完成滅菌，植種前加入

Tab. 3-2 Composition of trace element solution

Component	Final concentration (L ⁻¹)
HCl*	1.0 mL
NiCl ₂	0.05 g
H ₃ BO ₃	0.05 g
FeCl ₂	2.00 g
Na ₂ EDTA	0.50 g
CuCl ₂	0.03 g
ZnCl ₂	0.05 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.05 g
MnCl ₂	0.05 g
CoCl ₂	0.05 g
AlCl ₃	0.05 g
NaSeO ₃	0.10 g

* 先將 37% 的 HCl 以少許水稀釋後先加入 Na₂EDTA，待 Na₂EDTA 完全溶解後再加入各種微量金屬

Tab. 3-3 Composition of vitamin solution

Component	Final concentration (L ⁻¹)
Biotin	2.0 mg
Thiamine-HCl	5.0 mg
Pyridoxine-HCl	10.0 mg
Nicotinic acid	5.0 mg
Riboflavin	5.0 mg
Vitamin B12	0.1 mg
DL-Ca-pantothenate	5.0 mg
Lipoic acid	5.0 mg
P-aminobenzoic	5.0 mg
Folic acid	2.0 mg

3.4.2 菌群穩定性試驗

本研究以最佳的前培養時間作為次世代的植種時機，以連續培養的方式，並監測纖維降解與產氫的情形來確認此群微生物之穩定性。待菌群穩定後進行生長及代謝概況之探討，以 5 g/L 的纖維素做為其基質並培養在 55°C 下 96 小時，測定其纖維水解、生長、酸鹼值、代謝產物、醣類及產氫之變化。

3.5 環境因子之影響

3.5.1 溫度

對於微生物的生長溫度是一個相當重要的影響因子，當培養於適當的溫度條件下有利於菌體的生長以及纖維降解產氫的速率。本研究使用 α -cellulose 做為單一碳源，由於綠鬣蜥腸道菌群於馴養時之培養溫度為 55°C。因此上下調整測試溫度範圍，分別為 45、50、55、65 以及 70°C，基質濃度為 5 g/L 的纖維素，以 150 rpm 搖晃血清瓶進行培養，並監測細胞生長、纖維水解以及產氫的情形。

3.5.2 pH 值

在厭氧產氫的程序中，由於大量的酸生成使得環境中的 pH 值下降。低 pH 值不僅會降低 hydrogenase 的活性，更有可能改變微生物的代謝途徑。因此，pH 對於纖維水解產氫來說具有重大的影響。為測試此菌群之最適纖維水解產氫之 pH 範圍，利用 TA 培養基中本身含有 NaHCO₃ 與瓶頂空間中所填充的 CO₂ 之交互作用而形成密閉的碳酸緩衝系統，藉由調整 NaHCO₃ 的濃度來改變初始 pH 值。本實驗所設計之初始 pH 範圍為 5、6、7 和 8，基質濃度為 5 g/L 的纖維素以 150 rpm 搖晃血清瓶進行培養，並監測細胞生長、纖維水解以及產氫的情形。

Tab. 3-4 Relationship of initial pH tested and addition of NaHCO₃ concentration.

Concentration of NaHCO ₃ (g/L)	0.166	0.381	4.881	33.881
Initial pH	5.36	6.08	7.16	8.16

3.5.3 微量元素 (Fe²⁺ 和 Ni²⁺)

Tab. 3-2 為培養基中所加入的微量元素，其中 NiCl₂ 的最終濃度為 0.05 mg/L 而 FeCl₂ 的最終濃度為 2 mg/L。而本實驗是利用缺乏亞鐵

離子或鎳離子以及對照組（含 Tab. 3-2 所有的微量元素）對纖維水解產氫之影響，並對本系統必需的金屬離子進行濃度影響研究。實驗前需先配製不含 Fe^{2+} 之微量元素溶液，並於製備培養基時代替原本的 Trace element solution 一同加熱煮沸並除氧。

在鎳離子方面，由於 TA 培養基中原本就含有鎳離子，因此僅需重新配置不含 NiCl_2 之儲備溶液，其於做法與亞鐵離子相同。整個實驗過程培養在 55°C 、pH 為 7、5 g/L 的纖維素並以 150 rpm 搖晃血清瓶，每隔 12 小時以排水集氣法收集所產生的生物氣體，並監測細胞的生長及纖維素的降解情況。

3.5.4 亞鐵離子濃度

使用預先配製不含 Fe^{2+} 之 Trace element solution，並於泡製培養基時一同加熱煮沸並除氧。並單獨配置 500 g/L 的 FeCl_2 之儲備溶液，於植菌後分別以不同體積加入血清瓶中，使其最終濃度為 50、100、500 和 800 mg/L。

3.6 生物產氫潛能 (Biogas hydrogen production potential ; BHP)

實驗之反應容器為 125 mL 厭氧血清瓶，總反應體積為 75 mL，培養於 55°C 、pH 7 上下、基質濃度為 5 g/L 纖維素並以 150 rpm 搖晃血清瓶的方式進行實驗。氣體採樣及液體採樣由血清瓶頂部橡膠塞處以注射針抽取，生物氣體 (biogas) 產生量以間斷式排氣方式計算，以排水集氣法計算單位時間中所產生之總氣體體積，反應瓶之設置如 Fig. 3-3。利用 Fan *et al.* (2008) 文獻中提及的公式如 3-1 式，來計算氫氣產量（包括瓶頂空間以及排水集氣）。

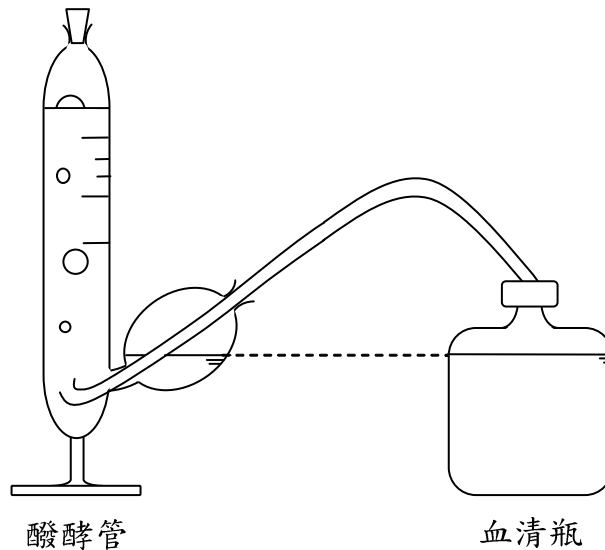


Fig. 3-3 Schematic diagram of determines biogas volume.

$$V = V_0\gamma_i + \sum V_i \gamma_i \quad (3-1)$$

V 代表的是累積的氫氣體積， V_0 代表的是第 i 個測試點中血清瓶之瓶頂空間的體積， V_i 代表的是第 i 個測試點時排水集氣所產氫的氣體， γ_i 代表的是第 i 個測試點下氫氣的百分比。

3.7 RSM 實驗設計

3.7.1 產氫最佳條件設定

由於溫度會影響 pH 值，而酸鹼亦會影響亞鐵離子解離的程度。因此，本研究將探討溫度、pH 值與亞鐵離子濃度對產氫的最適化。經由上述的研究結果，本系統培養在溫度 50-65°C、pH 值介於 6-8 及亞鐵離子濃度在 50-500 mg/L 之間具有最佳的氫氣產生速率（如 Fig. 4-10），固本實驗將條件設定在上述的範圍內。

3.7.2 中心混成設計

本實驗所設計之變數為溫度 (X_1)、初始 pH (X_2) 與亞鐵離子濃度 (X_3)，由 8 個二水準因子的角點設計、6 組軸點設計以及中心點重複 6 次，共計 20 組實驗。設定的參數如 Tab. 3-5 所示，其設計值

是依據 3-2 式所計算出來的。

$$x_i = \frac{X_i - X_i^*}{\Delta X_i} \quad (3-2)$$

x_i 代表的是第 i 個測試變數中的編碼變數， X_i 代表第 i 個測試變數值， X_i^* 代表中心點， ΔX_i 代表間距。本實驗所設計之變數為溫度 (X_1)、初始 pH (X_2) 與亞鐵離子濃度 (X_3) 三個變數。

3.7.3 RSM 實驗操作

實驗之反應容器為 125 mL 厭氧血清瓶，總反應體積為 75 mL，基質濃度為 5 g/L 纖維素並以 150 rpm 搖晃血清瓶的方式進行二重複實驗。各批次實驗皆以前培養 48 小時做為植種來源進行實驗。培養基的配置方法如 3.3.2 所示，並進行 96 小時的批次實驗。每隔固定時間進行採樣並監測其氣體產量、氫氣濃度、細胞生長、總醣濃度、纖維素降解與液相產物分析。

Tab. 3-5 Experimental design for optimizing fermentative hydrogen production process

Run	Temperature (°C)		Initial pH		Iron conc. (mg/L)	
	X_1	x_1	X_2	x_2	X_3	x_3
1	44.9	-1.682	7	0	275	0
2	50	-1	6	-1	500	1
3	50	-1	6	-1	50	-1
4	50	-1	8	1	500	1
5	50	-1	8	1	50	-1
6	57.5	0	8.7	1.682	275	0
7	57.5	0	7	0	653.4	1.682
8	57.5	0	5.3	-1.682	275	0
9	57.5	0	7	0	0	-1.682
10	65	1	6	-1	500	1
11	65	1	6	-1	50	-1
12	65	1	8	1	500	1
13	65	1	8	1	50	-1
14	70.1	1.682	7	0	275	0
15	57.5	0	7	0	275	0
16	57.5	0	7	0	275	0
17	57.5	0	7	0	275	0
18	57.5	0	7	0	275	0
19	57.5	0	7	0	275	0
20	57.5	0	7	0	275	0

Run 15-20 為中心點重複六次

3.7.4 統計分析

本實驗所探討的 response(Y 值) 為產氫速率(Hydrogen production rate, mL H₂/L/hr)。其反應曲面可利用二次方程式回歸，方程式如下：

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_{11} X_1^2 + \alpha_{22} X_2^2 + \alpha_{33} X_3^2 + \alpha_{12} X_1 X_2 + \alpha_{13} X_1 X_3 + \alpha_{23} X_2 X_3 \quad (3-3)$$

Y 代表反應數， α 代表經回歸後的係數，X₁ 在本研究中代表溫度，X₂ 代表初始 pH，X₃ 代表鐵離子濃度。

將產氫速率 (HPR) 的實驗結果輸入 Minitab 軟體進行分析，可得到方程式中各參考值，並進行曲面圖及等高線圖之繪製，即可得到三個變因與所探討的 Y 值相互影響之關係。

3.8 分析方法

3.8.1 細胞生長分析

蛋白質是構成細胞的主要成分，因此可利用測定蛋白質的濃度來代表細胞的生長情況。根據 Sawa *et al.* (1988) 對於進行白內障手術後眼前部症候群的研究發現，藉由 He-Ne laser 照射眼球測定蛋白質的濃度可估算細胞的數量，並以此非侵入性的方式評估眼睛發炎的程程度。因本實驗所使用的基質為不溶解性的 α -cellulose，故無法利用濁度的增加來表示細胞的生長。因此本研究以測定總蛋白質濃度來監測細胞生長情況。

本研究使用市售的蛋白質分析套件 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) 以 Bradford 測定細胞蛋白質的方法 (Bradford, 1976) 進行分析，利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 與蛋白質結合呈藍色的原理。當 G-250 與蛋白質結合後，G-250 會由紅色轉變成藍色，此時在 595 nm 波長下會有較高的吸收度以便測定。以牛血清蛋白

(Bovine serum albumin, BSA) 做為蛋白質檢量線的標準品；同時利用 α -cellulose 為基質進行總蛋白質換算細胞乾重之檢量線，於不同時間點每次取 100 mL 之培養液，先以濾紙 (Advantec GA-100; pore size: 1 μ m) 將纖維素去除，並利用離心的方式收集濾液中的細胞後烘乾秤重，同時測定總蛋白質並繪製蛋白質濃度 vs 細胞乾重之檢量線 (如附圖一)。

取 1 mL 的培養液經離心 (10000 rpm; 10 min) 後去除上層液。加入 1 mL Tris buffer (pH 7.6) 使細胞懸浮後再次離心並去除上層液，此步驟重複一次。經離心去除上層液後加入 0.9 mL Tris buffer (pH 7.6) 及 0.1 mL 1N NaOH，再次將細胞懸浮。以 100°C 沸水浴 15 分鐘，離心後取上層液稀釋，取 0.8 mL 的稀釋液並加入 0.2 mL Bio-Rad Protein Assay dye reagent，充分混合後於室溫下放置 5 分鐘，以分光光度計 (Spectrophotometer; SHIMADZU, UV mini-1240) 在波長 595 下測量其吸光值，代入檢量線並可得到蛋白質濃度。

3.8.2 纖維素濃度測定

纖維素雖然是由鍵結穩定的醣類所聚合而成的，但可經強酸破壞而分解成葡萄糖，再以特定化學物與醣分子結合並呈色達到定量之目的。本研究中恩酮比色法 (Anthrone colorimetry) 便是以弱酸配合加熱去除培養液中細胞的干擾 (Updegraff, 1969)，再用濃硫酸水解纖維素，最後以恩酮試劑呈色而有深綠色產生並以分光光度計在波長 620 nm 下定量之 (Viles and Silverman, 1949)。以 α -cellulose 作為纖維素標準品配製檢量線 (附錄二)。

取 0.5 mL 含纖維素之樣本，以 10000 rpm 離心 10 分鐘後去除上層液。加入 0.15 mL 預先配製之醋酸/硝酸溶液 (80% 濃醋酸: 65% 濃硝酸 = 10:1 (v/v))，均勻混合後沸水浴煮沸 30 分鐘破除細胞。經沸水浴後以 10000 rpm 離心 10 分鐘去除上層液後以去離子水清洗剩餘纖維素，再次離心後完全去除上層液。加入 0.1 mL 的濃硫酸 (96%)，

並於固定時間以 Vortex-Mixer 震盪，直到纖維素完全水解。取 0.1 mL 經濃硫酸混合均勻之溶液稀釋至 10 mL。取 1 mL 稀釋液並加入 2 mL 預先配製經冷藏至少 2 小時之恩酮試劑(0.2 g anthrone 以濃硫酸定量至 100 mL)，混合均勻後以沸水浴煮 16 分鐘。經冷水冷卻 2-3 分鐘後放置室溫 5-10 分鐘，最後以分光光度計在波長 620 nm 下測定其吸光值，並代入檢量線中求出纖維素濃度。

3.8.3 總溶解糖濃度測定

總溶解糖以酚-硫酸法(Phenol-sulfuric acid)測定之(Dubois, 1956)。在強酸環境下培養液中的多醣或寡醣將被完全水解轉為單醣，並形成穩定的淡黃色。實驗過程需 98% 濃硫酸以及預先配製 5% 酚溶液，並以葡萄糖為標準品製做檢量線(附錄三)。

將上層液做適當的稀釋，取 1 mL 稀釋液加入 0.5 mL 酚溶液後混合均勻，緩慢的將 2.5 mL 濃硫酸直接滴入液體中避免濃硫酸殘留於管壁，混合均勻後靜置 10 分鐘待反應完全後以冷水冷卻至室溫，利用分光光度計在波長 490 nm 下測其吸光值，並代入檢量線求得總糖濃度。

3.8.4 氣相產物分析

本實驗中總氣體量之收集是利用排水集氣法於固定時間測定其產氣情況，其反應瓶之設置如 Fig. 3-3。血清瓶瓶頂空間的氫氣濃度分析以 SHIMADZU GC-14B Gas Chromatograph 配合 thermal conductivity detector(TCD)，所使用的管柱為玻璃材質(長度 2.1 m；內徑 3.2 mm)，其填充物為 Porapak Q 50/80 mesh，注入的樣品體積為 0.4 mL 並以氫氣做為載流氣體(流速為 25 mL/min)。分析條件設定分別為：oven temperature 50°C、injector temperature 120°C、TCD temperature 140°C、current 60 mA。利用氫氣及二氧化碳配製不同濃度之標準品(附錄四)。

3.8.5 液相產物分析

利用高效能液相層析儀 (High performance liquid chromatography, HPLC) 分析培養液中代謝產物的種類 (醣類、揮發酸及醇類) 及濃度。注射量為 20 μl ，移動相為 0.008 N H_2SO_4 溶液 (0.6 mL/min)，分析管柱為 *Transgenomic* COREGEL 87H3 (300 mm \times 7.8 mm)，偵測器為 Refractive index detector (SHIMADZU, RID-10A)。根據纖維水解產氫可能的代謝產物 (葡萄糖、纖維雙醣、乳酸、乙酸、乙醇與丁酸) 選擇數種標準品配製檢量線 (附錄五)。

3.8.6 產氫能力分析 (Gompertz equation)

微生物代謝過程之變化，會先有一段遲滯期 (lag phase; λ) 再進入對數生長期，也就是最大反應速率 (R_m)，然後進入穩定期，此時所對應的結果為成長或代謝反應的平衡點。本研究在產氫的數據整理上使用 Gompertz equation 迴歸，此方程式初期是應用在人口成長模式上，後來才被應用於細菌成長之模式上，其方程式如下：

$$y = a \times \exp[-\exp(b - ct)] \quad (3-4)$$

此模式中之 a 、 b 、 c 等參數並無生物上的意義，僅描述細菌之數目，並不如 Monod model 一樣會考慮到基質消耗的問題，為讓此模式更利於在描述生物生長方面，因此需將此模式做適當之修正，修正式為：

$$H = H_{\max} \times \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{\max, \text{H}_2} \times c}{H_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (3-5)$$

H = 累積產氣量 (mL)

H_{\max} = 平衡時產氣量 (mL)

λ = 遲滯期 (hr)

t = 反應時間 (hr)

R_{\max,H_2} = 最大產氫速率 (mL/hr)

$e = 2.718$

將實驗數據代入上述方程式中迴歸可得到 λ 、 H 及 R_{\max,H_2} 三個參數； λ 會隨著植入的菌種來源不同而有差異； R_{\max,H_2} 為最大產氫速率，除以菌量可得單位菌量產氫速率； H 為最終產氣量，受基質量及菌種的產氫能力影響（白，1999）。

第四章 結果與討論

4.1 纖維素降解混合菌群之增富培養 (Enrichment)

本研究採用綠鬣蜥 (*Iguana iguana*) 的糞便作為纖維水解產氫菌來源。將 1 g 的糞便植種於以濾紙 (Whatman NO. 1) 為基質的厭氧培養基內置於 55°C 下進行增富培養 (Enrichment)。經增富培養後，利用位相差顯微鏡觀察菌體細胞在纖維素基質環境下之菌體，其結果如 Fig. 4-1 所示。在增富培養的過程中，培養基內的濾紙在六天內被菌群完全分解殆盡 (Fig. 4-2)。經氣體分析測得氫氣且未發現甲烷後，對此菌群進行穩定性試驗並瞭解其生長及代謝概況。

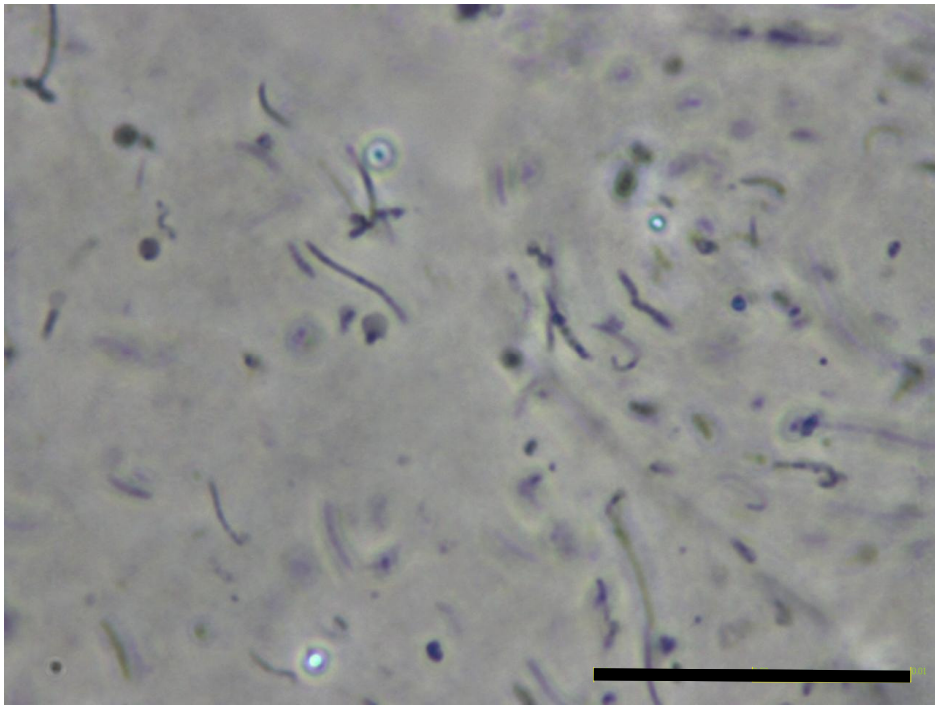


Fig. 4-1 Phase-contrast micrographs of green iguana enteric microflora mixed culture. Bar = 10 μ m.

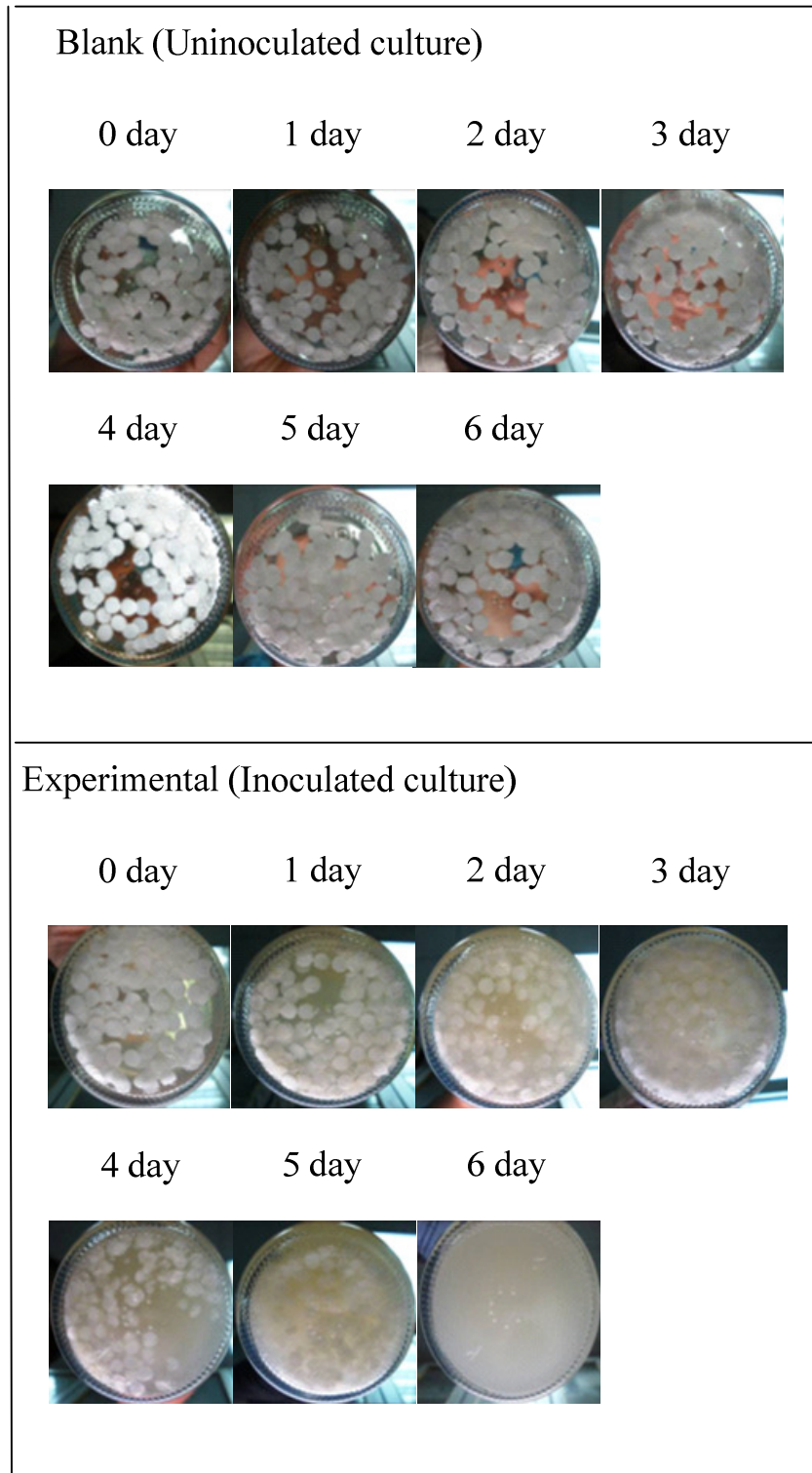


Fig. 4-2 Biodegradation of filter paper by anaerobic microorganisms from lizard fecal. Cultures were growth with 5 g/L filter paper.

4.1.1 前培養時間對纖維水解產氫的影響

利用變性梯度凝膠電泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) 對本菌群族群結構做初步的分析，發現有許多菌群會隨時間而有所消長。為了避免纖維水解菌或產氫菌隨培養時間的增加而遺失，本研究將對不同的培養時間進行探討。有研究亦針對前培養進行了探討，其中提出了幾個觀點：(1) 植種來源必須具有活性且健康的狀態方可縮短次代培養時的遲滯期、(2) 植種來源必須保有產生產物的能力 (Neves *et al.*, 2001)。因此為了植種來源的品質對前培養的時間 (轉菌的時機) 進行探討。

由 Fig. 4-3a 中可觀察到，每升的培養基中細胞的生長量只有些微的差異，約相差了 63.94 mg 的細胞乾重。而在不同的前培養時間中，纖維素的降解速率 (g/L/day) 分別為 1.60、1.81、2.00、2.32 以及 2.53 (轉菌時間為 48、60、72、84 和 96 hr)。雖然其降解速率有些微的差異但在反應 96 hr 後，纖維素均完全被水解，其平均反應速率約為 2.05 g/L/day (Fig. 4-3b)。纖維素的降解速率會有所差異是由於 cellulose 是屬於胞外酵素，當前培養的時間為 96 hr 時所累積的 cellulose 量會比前培養 48 hr 來的多，因此纖維水解的速率會有所差異。

但是，如 Fig. 4-3c、和 Fig. 4-3d 所示，不同的轉菌時間對氫氣的產量 (H₂ production)、產氫速率 (H₂ production rate) 及產率 (Yield) 皆有顯著的影響。前培養時間為 48 hr 的氫氣產量 (233.45 mL/L) 比前培養 96 hr 的產氫量 (41.39 mL/L) 多了 5.6 倍、產氫速率 (79.20 mL/L/day vs. 9.18 mL/L/day) 快了 8.6 倍而產率的部分 (43.78 mL/g vs. 6.29 mL/g) 則相差了 7 倍。綜合以上結果，混合菌群前培養時間為 48 hr 不僅不會遺失纖維水解菌，亦可得到較佳的氫氣產量。

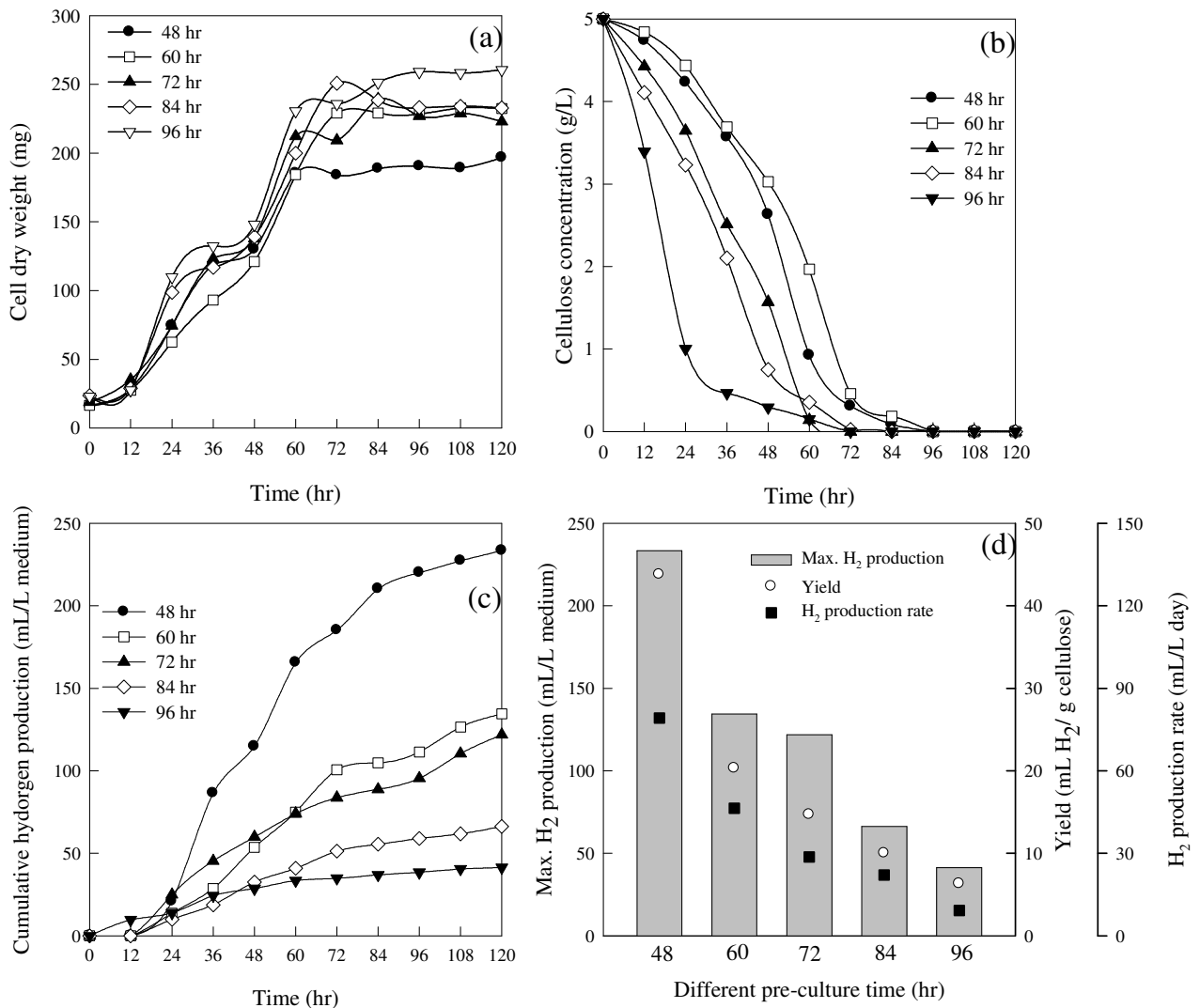


Fig. 4-3 Microbial growth (a), cellulose degradation percentage (b), cumulative hydrogen production (c) as well as H₂ yield and hydrogen production rate (d) of green lizard enteric bacteria with 5 g/L α -cellulose at different pre-culture time at 55°C.

4.1.2 菌群穩定性測試

本研究使用之蜥蜴腸道菌群於批次培養過程中發現生長在 48 hr 時具最強之纖維素醱酵產氫能力，為探討此微生物族群之穩定組成，以連續六個世代的批次培養對菌群的穩定性進行探討。Fig. 4-4 所示，在第一個世代的批次培養中纖維素的降解速率及產氫的速率都顯得較低（1.29 g/L/day 和 14.28 mL/L/day）。但是，在經過第四次繼代培養後已呈穩定的狀態，平均的纖維水解的速率及產氫速率分別為 2.29 g/L/day 和 90.75 mL/L/day。因此，將對此穩定菌群進行生長代謝情況的瞭解。

在轉植第四世代後纖維素的降解速率以及產氫速率突增是由於使用纖維素作為唯一基質，經多次繼代培養後菌群已呈穩定狀態，纖維水解菌及產氫菌為優勢菌群，因此纖維水解速率及產氫速率才會有突增的現象。

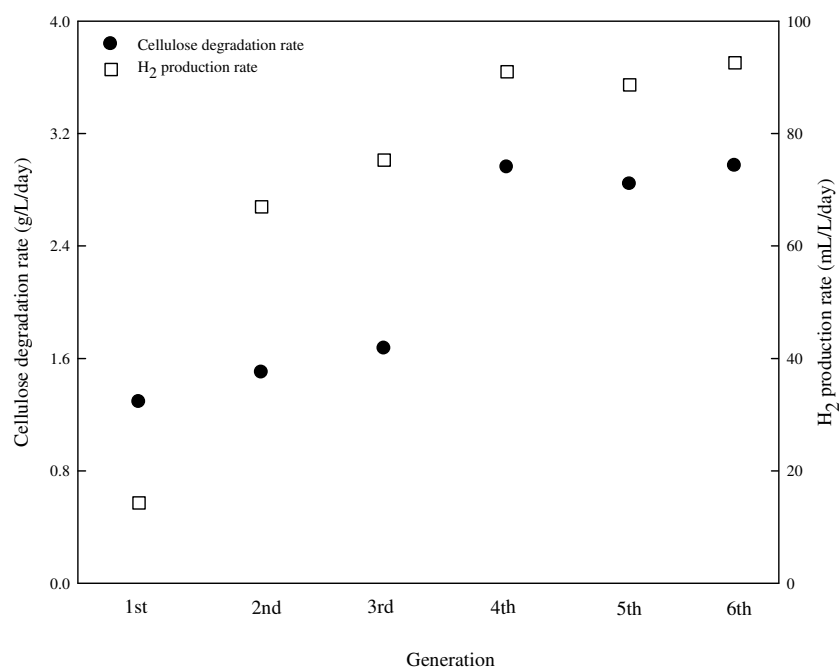


Fig. 4-4 Effect of continuous sub-culture on cellulose degradation rate and hydrogen production rate.

4.1.3 生長曲線

此實驗以 5 g/L 的纖維素做為其基質並培養在 55°C 下 96 小時，測定其纖維水解、生長、酸鹼值、代謝產物、醣類及產氫之變化。pH 值隨細胞的生長、纖維素的降解、氫氣的產生及乙酸的大量累積由 pH 7.1 下降到 pH 6 (圖 4-5a)。細胞生長的部分，無明顯遲滯期，培養 48 小時後菌體的生長進入平穩期。每升的培養基細胞乾重為 196.63 mg，而比生長速率為 0.04 hr^{-1} (圖 4-5b)。纖維素的部分可觀察到有 12 個小時的降解遲滯期，但隨後便迅速的進行降解，其降解速率約為 0.06 g/L/hr ，於 84 小時幾乎降解殆盡 (圖 4-5c)。

因轉菌時會將植種來源培養基內的醣類帶入新的培养基中，因此，0 小時的總溶解性醣類濃度高達 1.55 g/L (未植菌前經滅菌後的培养基)。由於纖維素的降解有 12 小時遲滯期，又因本實驗所使用的植種來源為混合菌群。因此，總溶解性醣的濃度於 12 小時有明顯的下降。隨後，隨纖維素的水解而有累積總溶解性醣類的現象 (圖 4-5d)。

在氫氣產量方面，並無明顯的遲滯現象，並於 60 小時後進入平穩的狀態。其氫氣產量約為 27.22 mL 與 Gompertz 所推算出的 27.46 mL 是相近的，而累積的氫氣產量為 362.98 mL/L。而氫氣產率及產氫速率分別為 57.97 mL/g 與 9.95 mL/L/hr (圖 4-5e)。

代謝產物的部分如圖 4-5f 所示，可明顯的觀察到乙酸及乙醇的累積 (乙酸大約增加了 1.1 g/L，乙醇增加了 0.3 g/L)。而丁酸只在 12 小時內有些微的增加 (52 mg/L)，隨後並沒有累積的情況，反而被緩慢的代謝殆盡。因此，由代謝產物的比例來看本系統的產氫方式較偏向於乙酸的產氫代謝路徑。

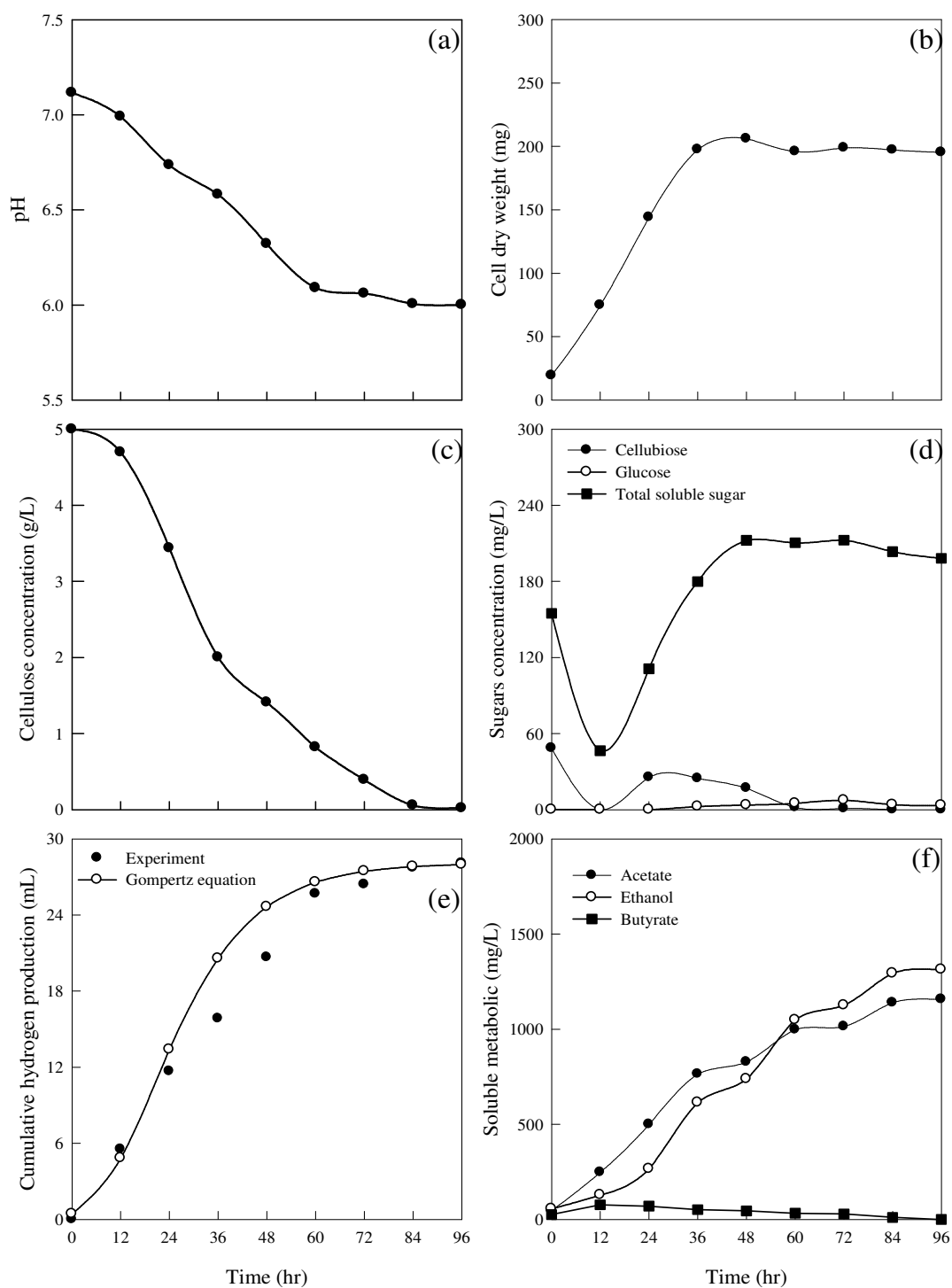


Fig. 4-5 Developments of operating pH (a), microbial growth (b), cellulose degradation percentage (c), sugars content (d), cumulative H₂ production (e) as well as soluble metabolic (f) of green lizard enteric bacteria with 5 g/L α -cellulose at 55°C.

4.2 環境因子之影響

4.2.1 溫度對生長、纖維素水解及產氫的影響

溫度對於細菌的生長有著直接的影響，本實驗是為了後續的反應曲面法探討綠鬣蜥腸道菌群纖維水解產氫適合的溫度範圍。實驗進行時利用不同溫度以 α -cellulose 為單一碳源進行測試，並監測蛋白質的濃度變化為細胞生長。

由 Fig. 4-6a 和 Fig. 4-6b 發現綠鬣蜥腸道菌群不適合培養在 70°C 的高溫下，除了細胞無法生長之外，纖維素水解產氫的效率甚差。此菌群除了 70°C 之外也不適合培養在 45°C 下。雖然細胞在 45°C 依然可分裂生長，但是纖維水解能力不佳。反應 96 hr 大約只降解了 40% 也就是 2 g/L 的纖維素。不僅如此，在這兩個極端溫度下氫氣的產量大約只有 58.11 mL/L。因此 45°C 及 70°C 不適合綠鬣蜥腸道菌群纖維水解產氫 (Fig. 4-6c 和 Fig. 4-6d)。

反之，由 Fig. 4-6 及 Tab. 4-1 皆可發現在 55°C 下有最佳的纖維水解速率 (0.17 g/L/hr) 及產氫速率 (9.44 mL/L/hr)，並且細胞的生長量 (以每升的培養基可得到的細胞乾重做為表示) 也是最佳的約為 176.48 mg，因此後續的實驗將溫度控制在 55°C 下進行。

Tab. 4-1 Comparison of cellulose hydrolysis and H₂ production potential by lizard enteric mixed culture at different temperatures

	45°C	50°C	55°C	65°C	70°C
Specific growth rate(hr ⁻¹)	0.03	0.09	0.10	0.02	0.01
Cellulose degradation rate (g/L/hr)	0.03	0.07	0.17	0.04	0.02
Hydrogen yield (mL H ₂ /g cellulose)	17.57	33.92	61.29	45.09	25.71
H ₂ production rate (mL/L/hr)	1.33	2.97	9.44	2.60	1.43

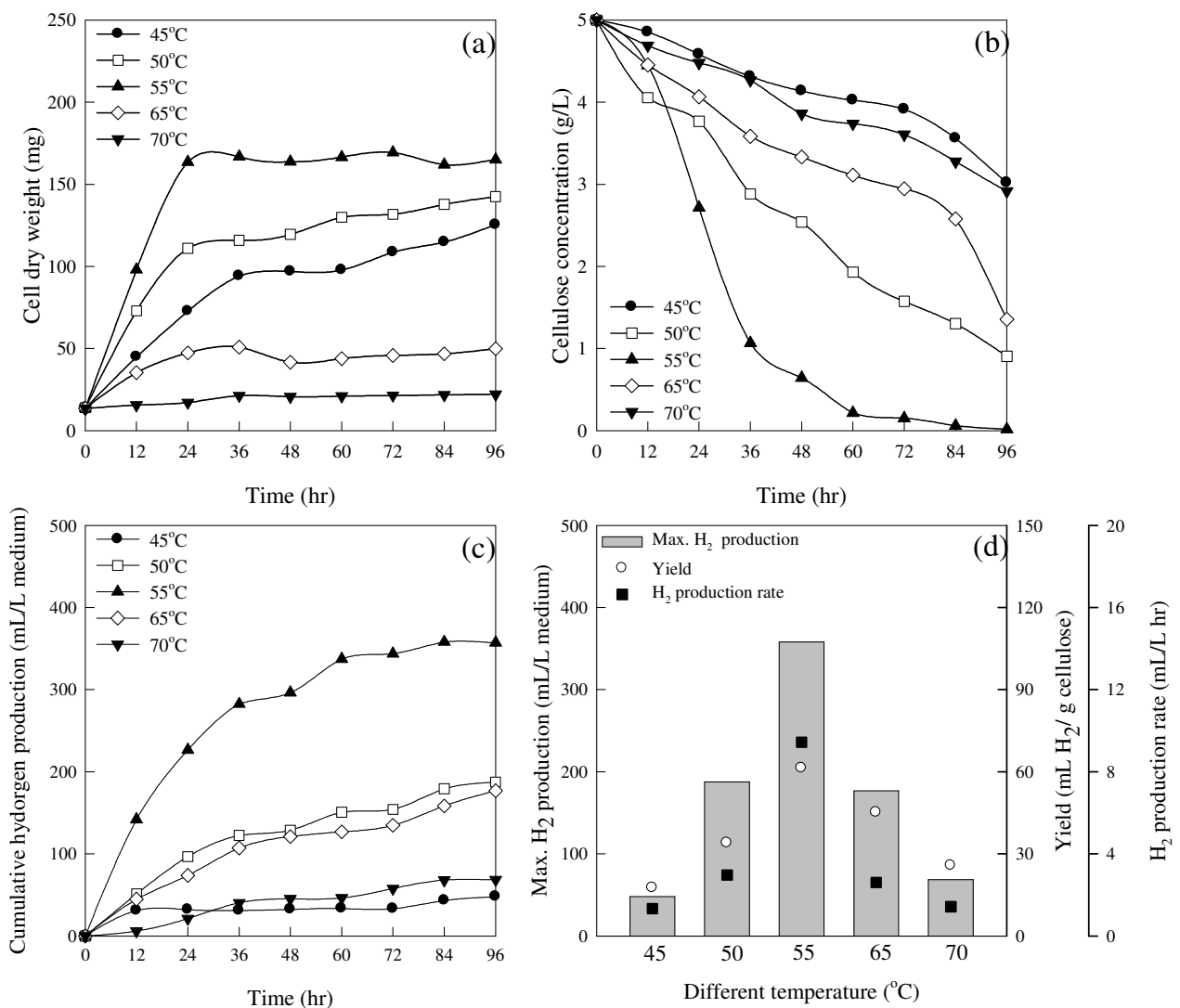


Fig. 4-6 Microbial growth (a), cellulose degradation percentage (b), cumulative hydrogen production (c) as well as H₂ yield and hydrogen production rate (d) of green lizard enteric bacteria with 5 g/L α -cellulose at different temperature.

4.2.2 pH 值對生長、纖維素水解及產氫的影響

本實驗是以改變培養基中 NaHCO_3 的濃度來調整 pH 值。由 Fig. 4-7b 可發現 pH 為 5 這個組別纖維水解的能力極差，反應 96 hr 只降解 18.3% 的纖維素。Mouriño *et al.* (2001) 指出菌體細胞能牢牢地附著在纖維素上是由於細胞能分泌一種稱為糖萼 (glycocalyx) 的胞外多醣體所造成。當 pH 低於 5.4 時除了纖維素的降解能力本身便到抑制之外，依附在纖維素上的細胞或糖萼同樣地也受到裂解或破壞。因此，纖維水解反應在 pH 值小於 6 時菌體附著上纖維素的能力較差，使得纖維水解的能力也相對的較慢。而當 pH 值小於 5.3 時將停止纖維素的水解作用 (Mouriño *et al.*, 2001)。因此較高的 pH 值對纖維水解的能力有益。如 Tab. 4-2 所示，在許多使用纖維素為基質的研究中，其最適的 pH 值為 7。

在纖維產氫的製程中，纖維素的的水解速率是整個程序的速率決定步驟 (Lai *et al.*, 2001)。因此在 pH 為 7 的培養基中纖維水解的速率高達 0.12 g/L/hr，於反應 60 hr 後幾乎被完全水解 (Fig. 4-7b)。因此，氫氣的產量 (Fig. 4-7c)、產率及產氫速率 (Fig. 4-7d) 也相對較高 (483.71 mL/L、96.74 mL H_2 /g cellulose 和 10.45 mL/L/hr) 而每升的培養基可得到的細胞生長量最佳，高達 219.04 mg 的細胞乾重 (Fig. 4-7a)。而 pH 8 的部分由於過鹼的環境不利於菌體的生長，不僅不具纖維水解的能力，且並無氫氣產生。

由 Tab. 4-3 和 Fig. 4-7 皆可明顯的發現 pH 5 及 pH 6 的產率相當的高，這是由於這兩組皆有氫氣的產生，但纖維水解的量卻又比 pH 7 來的少，因此經過計算後使得產率提高。所以，為了避免未降解纖維素而產生氫氣的情況，後續的實驗結果主要以產氫速率為主，而不以產率做為選取 RSM 範圍的依據。

Tab. 4-2 Effect of initial pH values on hydrogen fermentation

Inoculum	Substrates	Initial pH		Max. H ₂ yield
		Range studied	Optimal	
Cow dung compost	Beer lees wastes	4.5-9.0	7	68.6 mLH ₂ /g TVS ¹
Cow dung compost	Cornstalk wastes	4.0-9.0	7	149.69 mL/g TVS ²
Cow dung sludge	Cellulose	5.5-9.0	7.5	62.72 mL/g cellulose ³

¹Fan *et al.*, 2006b

²Zhang *et al.*, 2007

³Lin and Hung, 2008

Tab. 4-3 Comparison of cellulose hydrolysis and H₂ production potential by lizard enteric mixed culture at different pH

	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
Specific growth rate (hr ⁻¹)	0.03	0.04	0.08	0.00
Cellulose degradation rate (g/L/hr)	0.04	0.09	0.12	0.00
Hydrogen yield (mL H ₂ /g cellulose)	108.31	108.44	96.74	0.00
H ₂ production rate (mL/L/hr)	2.13	8.17	10.45	0.00

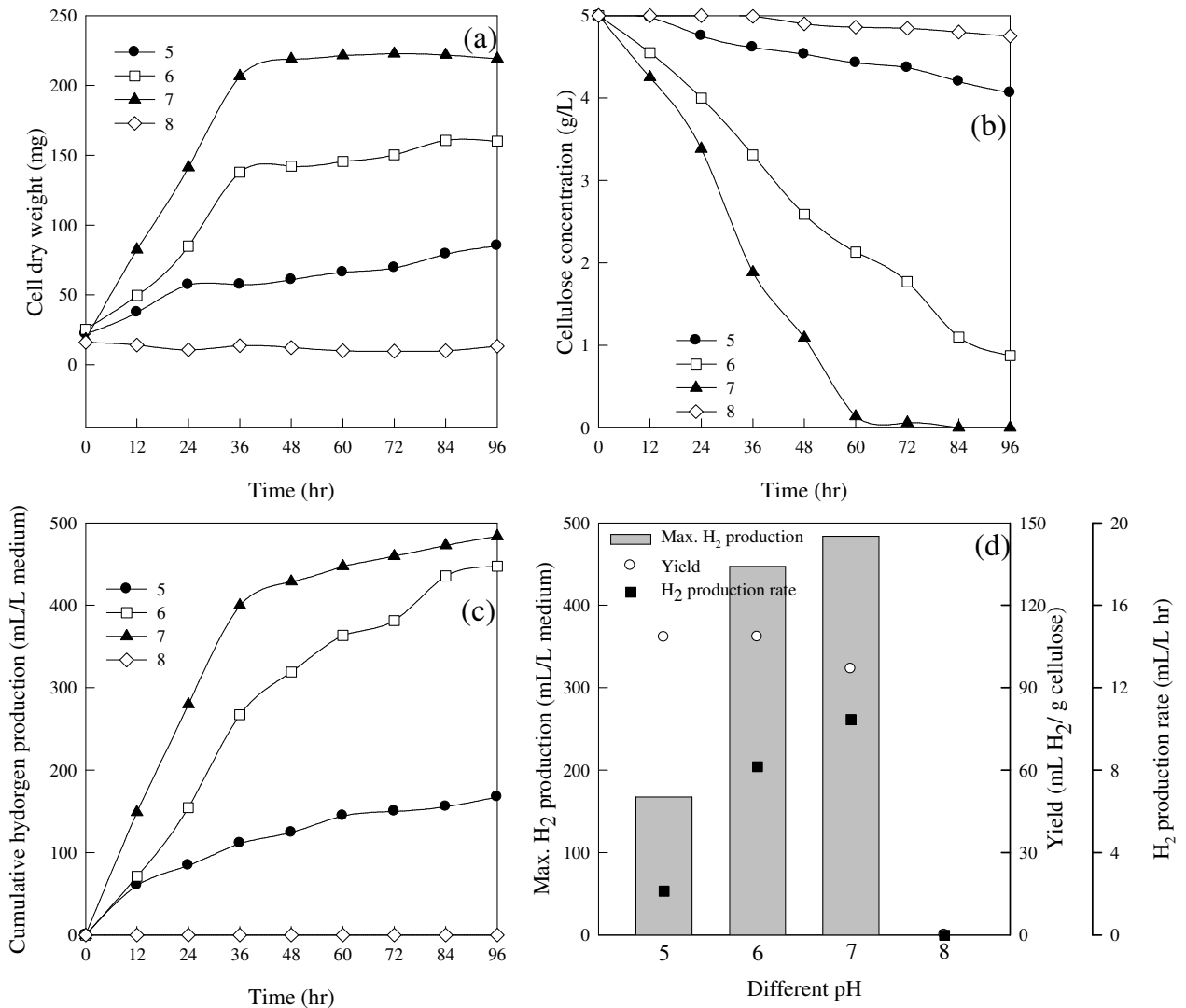


Fig. 4-7 Microbial growth (a), cellulose degradation percentage (b), cumulative hydrogen production (c) as well as H₂ yield and hydrogen production rate (d) of green lizard enteric bacteria with 5 g/L α -cellulose at different initial pH at 55 °C.

4.2.3 微量元素 (Fe^{2+} 、 Ni^{2+}) 對生長、纖維素水解及產氫的影響

Hydrogenase 一般分別為 [Ni-Fe] hydrogenase 和 [Fe-Fe] hydrogenase 兩種。其中以 [Ni-Fe] hydrogenase 較為廣泛的存在於微生物中，而只有少數的微生物，例如：*Clostridium pasteurianum* 和 *Desulfovibrio Desulfuricans* 皆擁有 [Fe-Fe] hydrogenase (Frey, 2002)。因此有許多的研究是利用鐵離子或鎳離子來激活此兩種類型的 hydrogenase 以達到提高氫氣產量的目的 (Karadag, 2010)。

由 Fig. 4-6 及 Tab. 4-4 所示，不添加 NiCl_2 (含有亞鐵離子) 不僅不影響纖維素的降解 (在反應 72 hr 後幾乎將纖維素分解殆盡，且纖維素的降解速率為 0.1 g/L/hr)，在產氫的表現上比 with $\text{Ni}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ 佳，氫氣的產率約為 with $\text{Ni}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ 的 1.1 倍 (81.44 mL/L with Fe^{2+} vs. 75.36 mL/L with $\text{Ni}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$)，而產氫的速率將近 1.2 倍 (14.74 mL/L/hr with Fe^{2+} vs. 12.55 mL/L/hr with $\text{Ni}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$)。反觀，不添加亞鐵離子的組別，不僅影響了纖維素的降解速率也降低了氫氣的產量。Khan et al. (1979) 的研究中指出鐵離子濃度低時纖維素的降解能力將會下降。因此認為亞鐵離子對於本系統的纖維水解產氫具有較顯著的影響。

Tab. 4-4 Effect of nickel and ferrous ions on the specific growth rate, cellulose degradation of hydrogen production by the iguana enteric mixed culture

	With $\text{NiCl}_2/\text{FeCl}_2$	With FeCl_2 only	With NiCl_2 only
Specific growth rate (hr^{-1})	0.07	0.08	0.07
Cellulose degradation rate (g/L/hr)	0.10	0.10	0.06
Hydrogen yield (mL H_2 /g cellulose)	75.36	84.44	48.67
H_2 production rate (mL/L/hr)	12.55	14.74	6.03

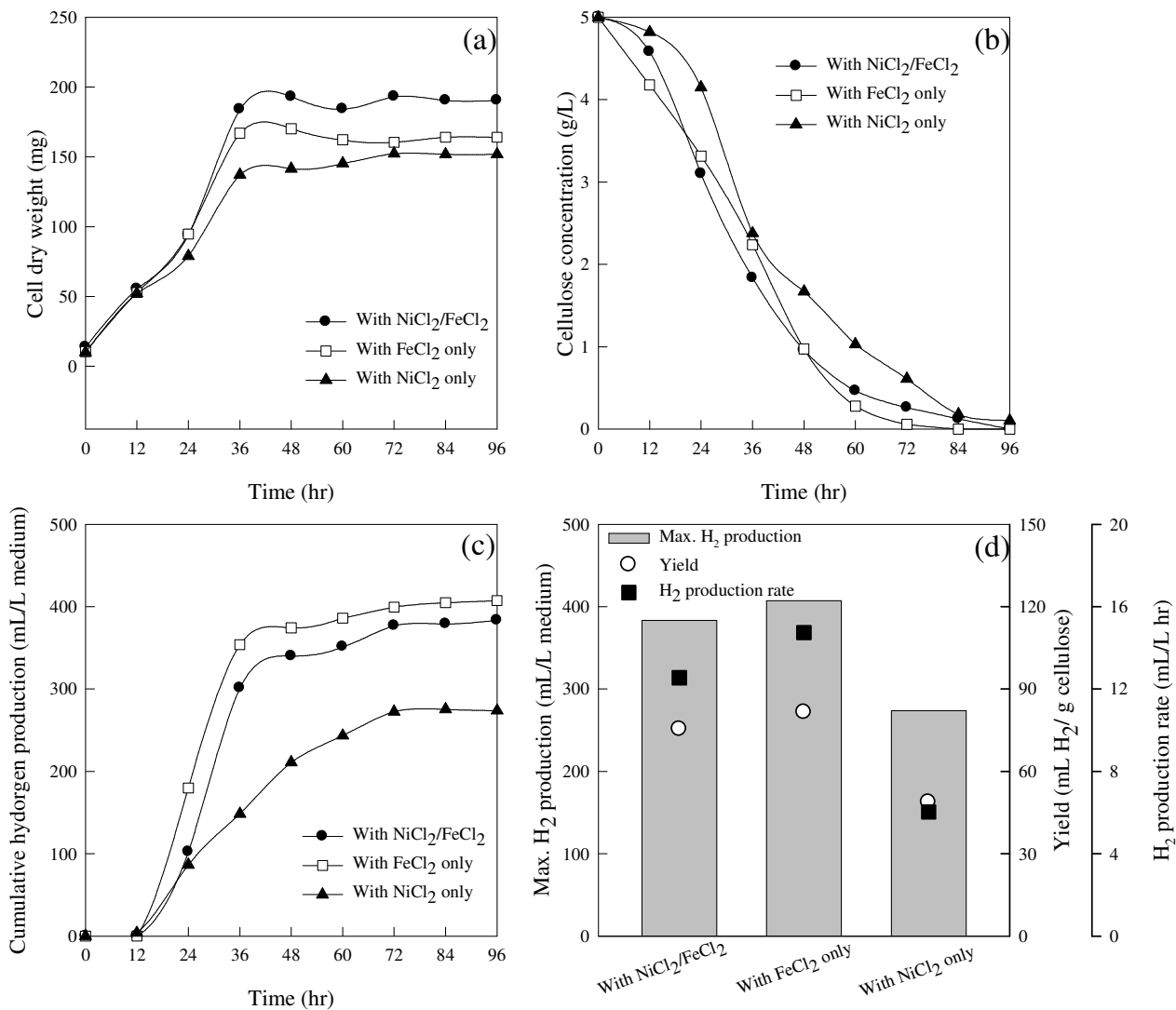


Fig. 4-8 Microbial growth (a), cellulose degradation percentage (b), cumulative hydrogen production (c) as well as H₂ yield and hydrogen production rate (d) of green lizard enteric bacteria with 5 g/L α -cellulose at different trace element at 55°C.

4.2.4 亞鐵離子濃度對生長、纖維素水解及產氫的影響

經微量元素實驗證實，亞鐵離子對於本系統產氫的影響力較為顯著。因此本實驗分別以不同濃度（50-800 mg/L）的 FeCl₂ 來進行產氫測試。結果如 Fig. 4-9 所示，當亞鐵離子的濃度高於 500 mg/L 時將對纖維素的降解造成影響，降低纖維水解率。而在細胞的生長方面不同濃度的亞鐵離子並不會對其造成影響。在產氫方面，亞鐵離子的濃度為 50-500 mg/L 時平均的最大氫氣產量為 415 mL/L，但濃度高達 800 mg/L 時反而抑制了產氫（242.33 mL/L）。

就氫氣的產率而言，亞鐵離子的濃度為 50-500 mg/L 的產率是較高的，其是 500 mg/L（104.8 mL H₂/g cellulose）。這是因為此濃度下的產氫量高，但纖維素的水解不佳，經計算後使得產率提高。Tab. 4-5 為本實驗與其他研究最佳亞鐵離子濃度之比較表。

Tab. 4-5 Effect of iron concentration on hydrogen production from different substrates by various microbial sources

Inoculum	Substrates	Concentration (mg/L)		Max. H ₂ yield
		Range studied	Optimal	
Lizard feces*	Cellulose	22-352.8	220.5	104.8 mL/g cellulose
Crass compost ¹	Food wastes	0-250	132	77 mL/g TVS
Cracked cereals ²	Starch	1.2-100	10	140 mL/g starch
Anaerobic sludge ³	Starch	0-1473.7	55.3	296.2 mL/g starch
Mixed culture ⁴	Sucrose	0-1842.1	589.5	178.81 mL/g sucrose
Digested sludge ⁵	Glucose	0-1500	350	311.2 mL/g glucose

* This study

¹Lay *et al.*, 2005

²Liu and Shen, 2004

³Yang and Shen, 2006

⁴Zhang *et al.*, 2005

⁵Wang and Wan, 2008b

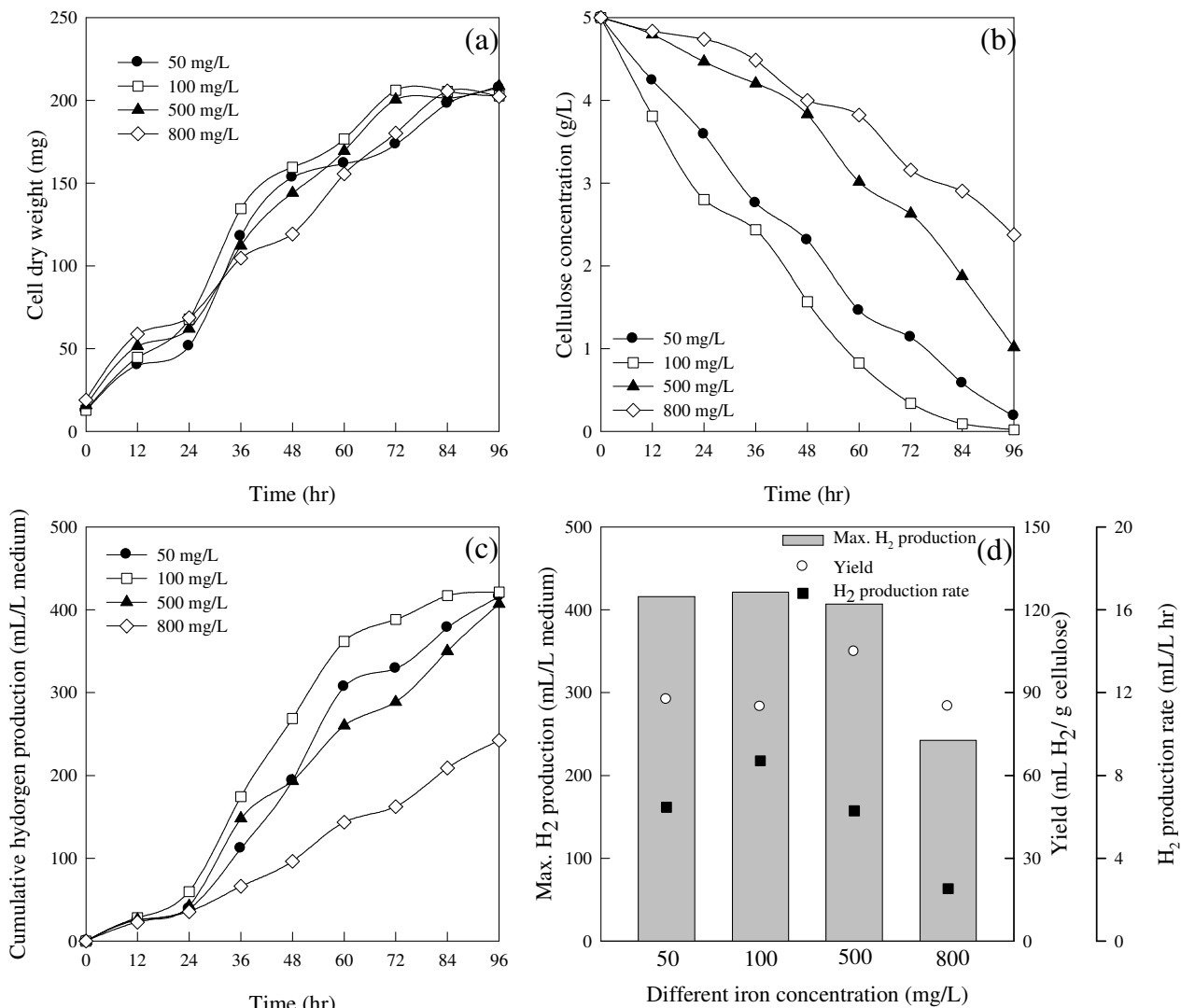


Fig. 4-9 Microbial growth (a), cellulose degradation percentage (b), cumulative hydrogen production (c) as well as H₂ yield and hydrogen production rate (d) of green lizard enteric bacteria with 5 g/L α -cellulose at different iron concentration at 55°C.

4.3 RSM 實驗設計

4.3.1 產氫最佳條件設定

由於溫度會影響 pH 值，而酸鹼亦會影響亞鐵離子解離的程度。因此，本研究將探討溫度、pH 值與亞鐵離子濃度對產氫的最適化。經由上述的研究結果，本系統培養在溫度介於 50-65°C、pH 值介於 6-8 及亞鐵離子濃度在 50-500 mg/L 之間具有最佳的氫氣產生速率(如 Fig 4-10)，因本實驗將條件設定在上述的範圍內。

4.3.2 中心混成實驗之產氫結果

本實驗由於 pH 值是利用 NaHCO₃ 與瓶頂空間所充填的 CO₂ 進行交互作用形成封閉的碳酸緩衝系統，因此酸鹼值大約有 ± 0.2 的誤差。Run 1、6-9 以及 14 為軸點設計，分別為超過設定範的極大極小值設計。Run 2-5 以及 10-13 為角點設計，以設計範圍的最大最小值進行設計。Run 15-20 為中心點設計，以設定範圍的中心點進行六次重複實驗。

結果如 Tab. 4-6 所示，在軸點設計中 Run 1 及 14 為溫度的極大極小值，因此在這兩個極端的溫度下纖維素的降解量不到 1 g/L、纖維降解速率為 0.01 g cellulose/L/hr 甚至在 70°C 下更低。就產氫的部分而言，在 45°C 下產氫的速率大約為 0.7 mL H₂/L/hr，而 70°C 下由於不產生氫氣因此無法計算產氫速率，故標記為 N.D.。

Run 6 以及 Run 8 為 pH 的極大和極小值，分別為 pH 8.7 及 5.3。在上述 pH 的批次實驗曾提過有研究指出纖維水解反應在 pH 值小於 6 時菌體附着上纖維素的能力較差，使得纖維水解的能力也相對的較慢，而當 pH 值小於 5.3 時將停止纖維素的水解作用 (Mouriño *et al.*, 2001)。因此初始 pH 為 5.3 時纖維素不進行降解，由於無醣類的產生所以間接影響產氫的能力。Run6 的 pH 值為 8.7，因此纖維素水解的能力較佳 (90.9%)，由於纖維素的降解速率 (0.07 g/L/hr) 佳所以產氫的速率可達 11.8 mL H₂/L/hr。

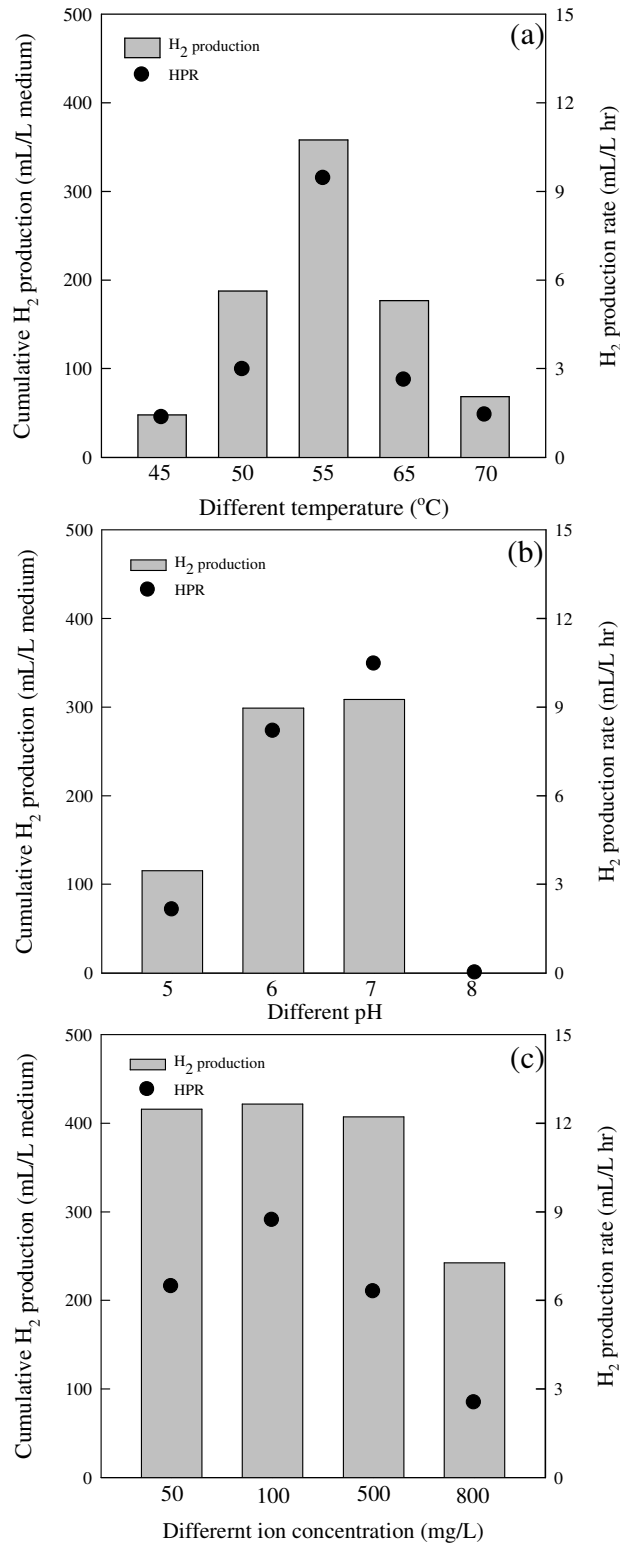


Fig 4-10 The design range of RSM ◦ (a) Temperature (50-65°C)、(b) initial pH (6-8) and (c) iron concentration (50-500 mg/L) .

而 Run 7 以及 Run 9 為亞鐵離子的極大極小值，分別為 653 mg/L 與 0 mg/L。根據文獻指出鐵濃度為 0.4 mM-0.6 mM (換算成本實驗室所使用的 FeCl_2 為 79.48-119.23 mg/L) 時纖維素的降解能力較佳 (Khan *et al.*, 1979)。但 Run 7 以及 9 這兩個組別雖然濃度不在上述的範圍之內，但纖維素的降解百分比依然達 95 % 以上，且纖維素的降解速率也有 0.03 g/L/hr。由於 Run 7 亞鐵離子的濃度過高使得產氫的速率只有 6.6 mL/L/hr。

Run 2-5 以及 Run 10-13 為角點設計，溫度分別為 50 以及 65°C、pH 值為 6 與 8 且亞鐵離子濃度為 50 和 500 mg/L。實驗主要是以溫度做為分組的基準，同溫度者一同進行批次實驗。在 50°C 下，Run 2 以及 Run 3 的 pH 為 6；Run 4 與 Run 5 的 pH 為 8。可由 Tab. 4-6 中觀察到在相同的 pH 值下，亞鐵離子的濃度為 50 mg/L 時纖維降解的百分比 (Cdp) 皆比亞鐵離子濃度為 500 mg/L 時佳。這樣的結果與先前的實驗結果一致。

在先前的批次實驗中，培養在 55°C 與 pH 7 的條件下亞鐵離子濃度為 500 mg/L 時纖維素的降解百分比為 79.67 %，而濃度為 50 mg/L 時纖維素的降解百分比高達 96.28 %。而在相同的亞鐵離子濃度下 pH 8 的纖維降解百分比較 pH 6 好。這是由於 pH 值小於 6 時菌體附著上纖維素的能力較差，使得纖維水解的能力也相對的較慢 (Mouriño *et al.*, 2001)。同樣地，在同溫的情況下纖維素的降解速率及產氫速率皆是在 pH 8 以及亞鐵離子濃度為 50 mg/L 的條件下最佳。

因此在角點設計中 Run 13 的條件較有利產氫，其產量約為 69.25 mL。其溫度為 65°C、pH 值為 8 以及亞鐵離子濃度為 50 mg/L；纖維素的降解百分比 (Cdp)、纖維素的降解速率 (CDR) 以及產氫速率 (HPR) 分別為 98.3 %、0.06 g/L/hr 和 18.9 mL/L/hr。

Tab. 4-6 Experimental design for optimizing fermentative hydrogen production process and the corresponding experimental results

Run	Temp. (°C)	Initial pH		Iron conc. (mg/L)	Final pH	Cdp ¹	CDR ²	HPR ³
		Design	Penetrate					
1	45	7	7.14	275	6.95	15.1	0.01	0.7
2	50	6	6.12	500	5.93	10.6	0.02	0.7
3	50	6	6.19	50	5.39	14.7	0.02	1.2
4	50	8	7.95	500	7.90	12.4	N.D. ⁴	0.3
5	50	8	8.02	50	7.55	62.9	0.04	13.7
6	57.5	8.7	8.63	275	7.57	90.9	0.07	11.8
7	57.5	7	7.04	653	6.47	95.1	0.04	6.6
8	57.5	5.3	5.15	275	5.21	0.3	N.D.	N.D.
9	57.5	7	7.19	0	5.95	97.6	0.03	11.1
10	65	6	6.16	500	6.29	28.5	0.02	1.8
11	65	6	6.10	50	6.10	20.4	0.02	4.2
12	65	8	7.80	500	8.14	21.3	N.D.	0.5
13	65	8	7.88	50	7.85	98.3	0.06	18.9
14	70	7	7.21	275	7.13	10.2	N.D.	N.D.
15	57.5	7	7.04	275	6.56	100	0.17	15.4
16	57.5	7	7.11	275	6.60	100	0.15	18.6
17	57.5	7	7.06	275	6.61	100	0.13	16.7
18	57.5	7	7.07	275	6.57	100	0.16	16.9
19	57.5	7	7.07	275	6.60	100	0.16	18.2
20	57.5	7	7.06	275	6.60	100	0.15	15.6

¹ Cdp: Cellulose degradation percentage (%)

² CDR: Cellulose degradation rate (g cellulose/L/hr) ; N.D., cellulose degradation rate < 0.005 g/L/hr

³ HPR: Hydrogen production rate (mL H₂/L/hr)

⁴ N.D. : not detected.

Run 15-20 為中心點重複六次，培養溫度為 57.5°C、pH 為 7 且亞鐵離子的濃度為 275 mg/L。纖維素的降解速率佳，平均每組重複試驗的纖維降解速率高達 0.15 g/L/hr，並且可在 96 小時內完全降解殆盡。在產氫方面，平均的氫氣百分比為 28.10 %；最大的氫氣產量平均亦達 611.51 mL/L；產氫速率亦高達 16.9 mL/L/hr。

4.3.3 產氫速率之最適培養條件

以 RSM 實驗設計法得到之產氫速率 (H₂ production rate) 最適培養條件如 Fig. 4-11 至 Fig 4-13 所示。經由此實驗設計方法得到之最適培養條件：溫度為 57.5°C、初始 pH 值為 7.8 及亞鐵離子濃度為 100 mg/L，而所預測之最大產氫速率為 20.19 mL/L/hr。經由統計分析所得之 p 值如表 4-7 所示，其回歸方程式如下：

$$\begin{aligned} \text{H}_2 \text{ production rate (mL H}_2\text{/L/hr)} \\ &= 16.87 + 0.61x_1 + 3.32x_2 - 3.09x_3 - 5.67x_1^2 - 3.71x_2^2 \\ &\quad - 2.67x_3^2 + 0.16x_1x_2 - 0.86x_1x_3 - 3.61x_2x_3 \\ &\quad \quad \quad (R^2=0.916) \end{aligned}$$

其中 x_1 是溫度、 x_2 反應初始 pH 且 x_3 為亞鐵離子濃度。各應變數之間的一次線性項 (Linear)、二次方項 (Square)、交互作用項 (Interaction) 以及整個模型 (Regression) 皆具有顯著性 (p -value < 0.05)。Tab. 4-7 顯示出溫度、初始 pH 值以及亞鐵離子濃度對產氫速率之整體總合作用的分析結果。由此表可得知，初始 pH 值與亞鐵離子濃度皆有極顯著的影響 (p -value < 0.01)；而溫度雖然未達顯著水準 (p -value = 0.331)，不過在統計學的意義中我們也不能忽視其對迴歸方程式的影響。

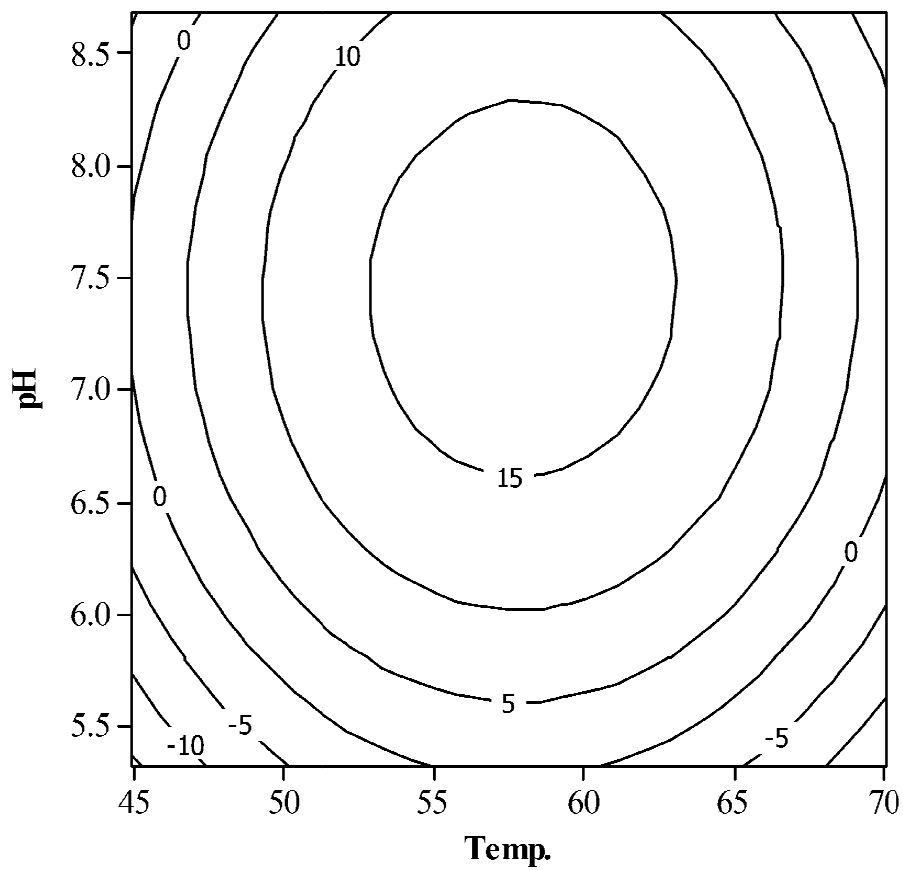
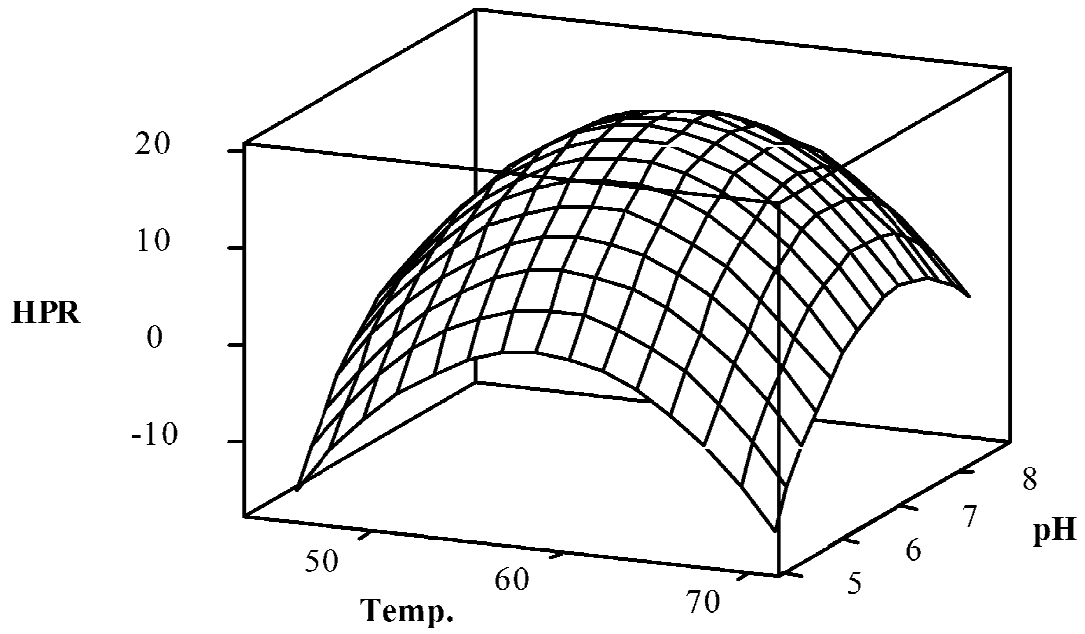


Fig. 4-11 Response surface plot and its contour plot for H₂ production rate: effects of initial pH and temperature.

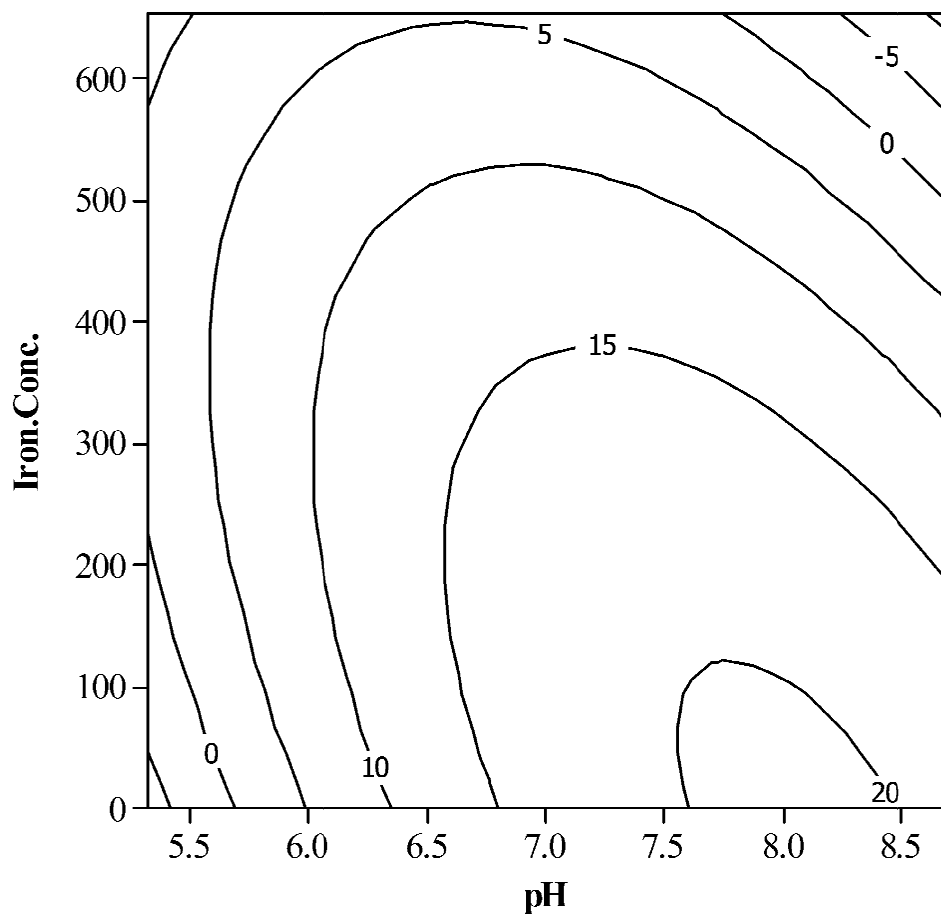
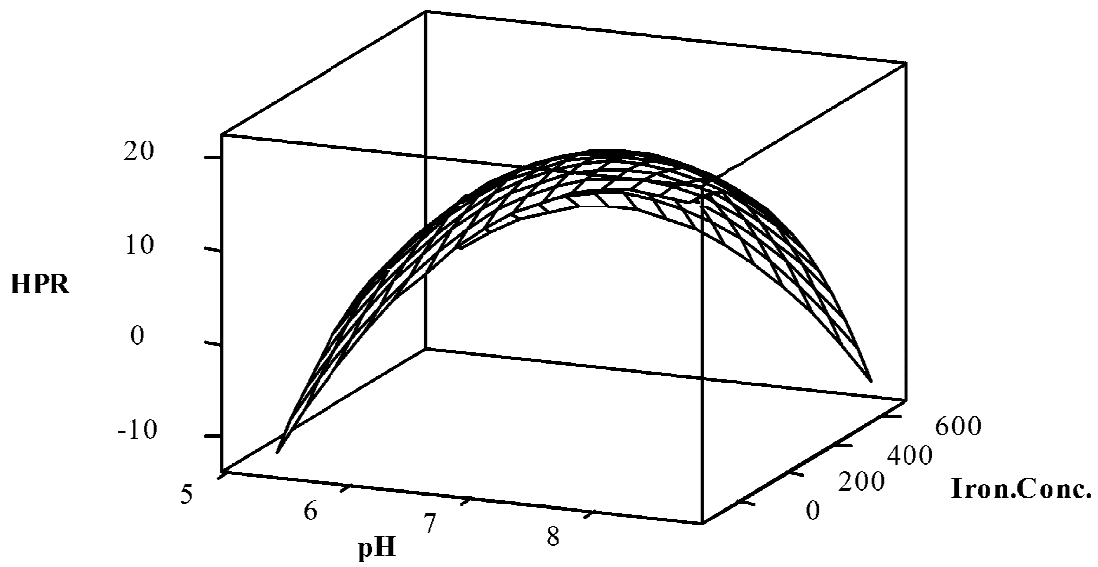


Fig. 4-12 Response surface plot and its contour plot for H₂ production rate: effects of initial pH and iron concentration.

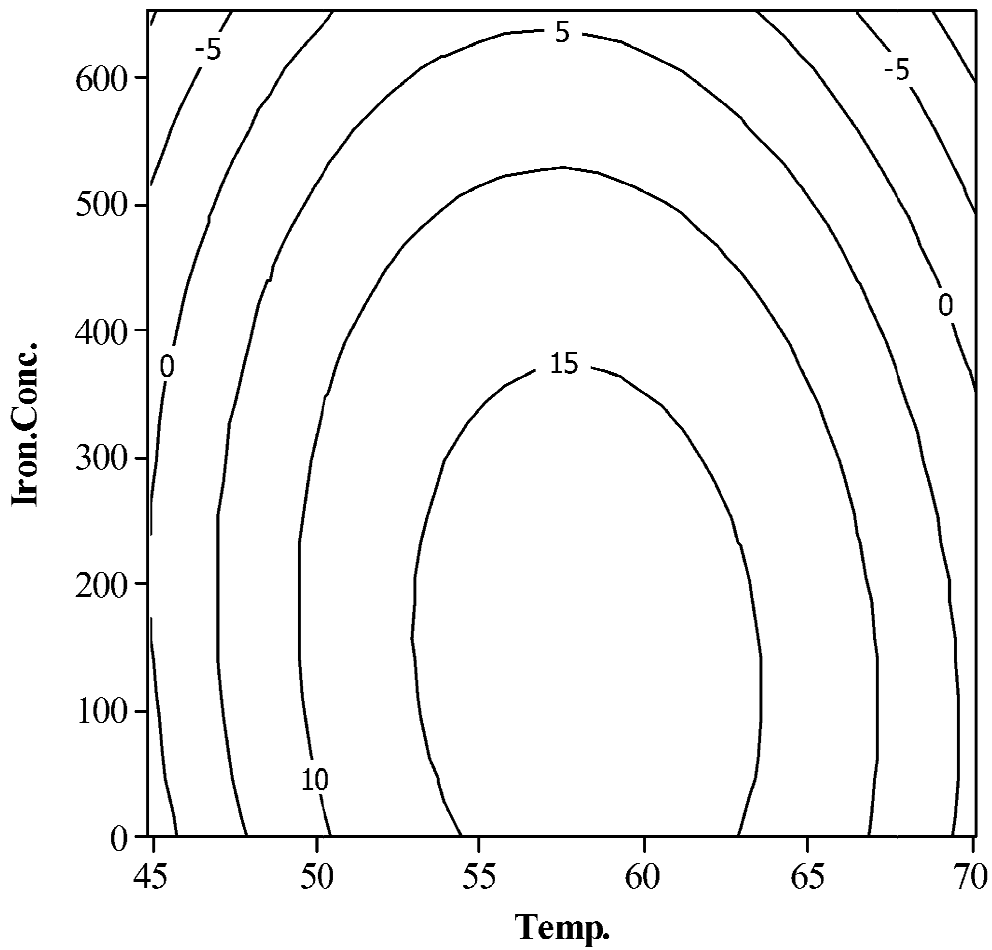
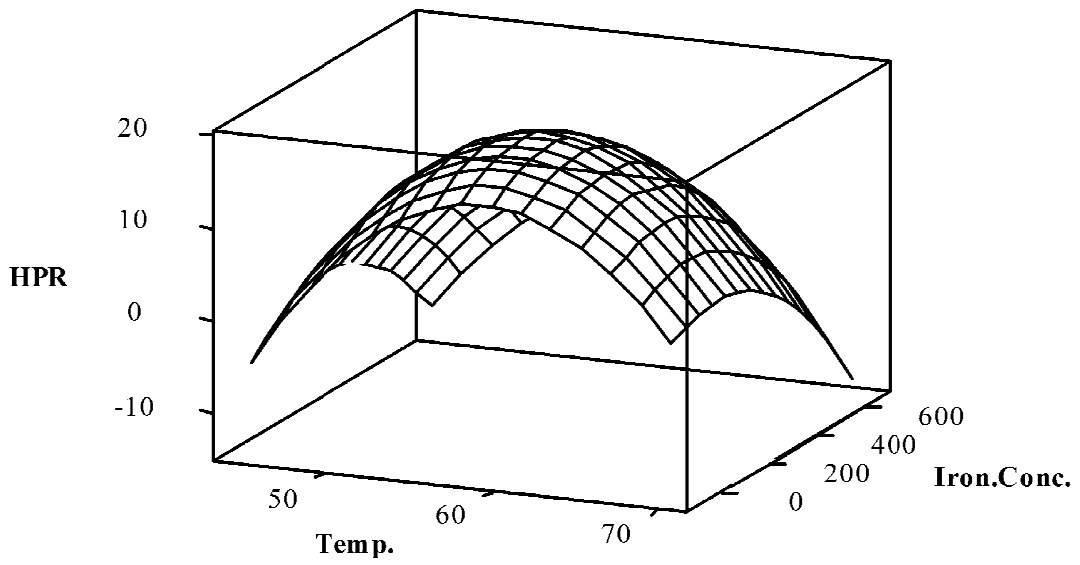


Fig. 4-13 Response surface plot and its contour plot for H₂ production rate: effects of temperature and iron concentration.

Factor	Coefficient estimate	<i>p</i> value
--------	----------------------	----------------

Tab. 4-7 Estimated regression coefficients for HPR

Constant	16.87	<0.001
X ₁ -Temp.	0.61	0.331
X ₂ -Initial pH	3.32	<0.001
X ₃ -Iron conc.	-3.09	<0.001
X ₁ ²	-5.67	<0.001
X ₂ ²	-3.71	<0.001
X ₃ ²	-2.67	0.001
X ₁ X ₂	0.16	0.839
X ₁ X ₃	-0.86	0.295
X ₂ X ₃	-3.61	0.001
Regression	-	<0.001
Linear	-	<0.001
Square	-	<0.001
Interaction	-	0.006

4.3.4 纖維水解產氫最適化驗證

此實驗以 5 g/L 的纖維素做為其基質並培養在 57.5°C、初始 pH 值 7.8 以及亞鐵離子濃度 100 mg/L 的條件下 96 小時，測定其纖維水解、生長、酸鹼值、代謝產物、醣類及產氫之變化。pH 值隨細胞的生長、纖維素的降解、氫氣的產生及乙酸的大量累積由 pH 7.76 下降到 pH 7.46 (Fig. 4-14)。纖維素降解的部分並無明顯遲滯期，其降解速率約為 0.13 g/L/hr，並且於 84 小時幾乎降解殆盡。細胞生長的部分，無明顯遲滯期且培養 48 小時後菌體的生長進入平穩期。每升的培養基可得到的細胞乾重達 259.35 mg，而比生長速率為 0.09 hr⁻¹。

因轉菌時會將植種來源培養基內的醣類帶入新的培养基中，因此，0 小時的總溶解性醣類濃度高達 158.83 mg/L。雖然纖維素的降解可產生醣類，但隨細胞的生長以及氫氣、乙酸、乙醇與丁酸的生成而使

醣類的濃度降低。而化學需氧量 (Chemical oxygen demand ; COD) 的部分也由 8.4 g COD/L 下降至 4.8 g COD/L。

在氫氣產量方面有 12 小時的遲滯期，經 72 小時後進入平穩的狀態。其氫氣產量約為 64.71mL 與 Gompertz 所推算出的 63.28 mL 是相近的，而累積的氫氣產量為 860.64 mL/L。而氫氣產率及產氫速率分別為 115.41 mL/g 與 19.82 mL/L/hr。

代謝產物的部分，可明顯的觀察到乙酸及乙醇的累積 (乙酸大約增加了 1.5 g/L, 乙醇增加了 1.2 g/L), 而丁酸只有些微的增加(0.3 g/L)。因此，由代謝產物的比例來看本系統的產氫方式較偏向於乙酸的產氫代謝路徑。

Tab 4-8 為本研究與前人文獻之比較結果，所使用的實驗設計方法皆為反應曲面法 (RSM) 的中心混成設計 (CCD)。由於實驗設計的因子皆不同，因此在比較上是以利用相同的實驗設計方法做為基準進行產氫速率 (HPR) 或是比產氫速率 (SHPR) 進行比較。

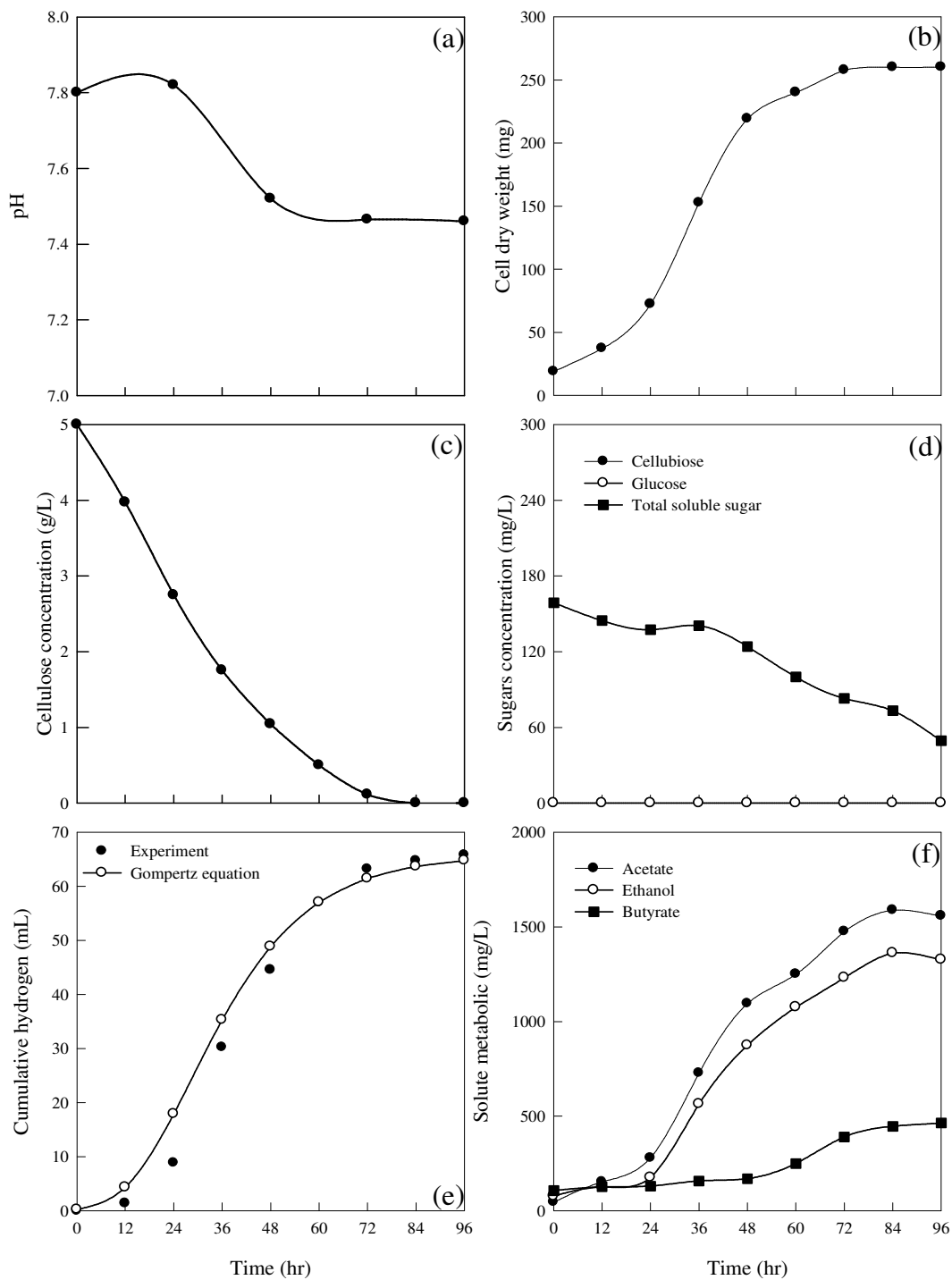


Fig. 4-14 Developments of operating pH (a), microbial growth (b), cellulose degradation percentage (c), sugars content (d), cumulative H₂ production (e) as well as soluble metabolic (f) of green lizard enteric bacteria with 5 g/L α -cellulose at 57.5°C, pH 7.8 and iron concentration 100 mg/L.

Tab. 4-8 Comparison of hydrogen production rate with optimal conditions in this study to the results of other literatures

Inoculum	Substrate	Factors studied	Results	Reference
Lizard faeces	α -cellulose	Temperature, initial pH and iron concentration	19.82 mL/L/hr ¹ or 185.34 mL/g dry cell/hr ²	This study
Anaerobic seed sludge	Food waste*	Inoculums concentration, substrate concentration and citrate buffer concentration	16.86 mL/g VSS/hr ²	Sreela-or <i>et al.</i> , 2011
Anaerobic sludge	Wheat powder	C/N and C/P ratio	98 mL/g biomass/hr ²	Argun <i>et al.</i> , 2008
Anaerobic seed sludge	Palm oil mill effluent (POME)	H ₂ NCONH ₂ (urea), Na ₂ HPO ₄ and FeSO ₄ · 7H ₂ O	75.99 mL/L/hr ¹	Yossan <i>et al.</i> , 2012
Anaerobic sludge	POME	Iron concentration, C/N and C/P ratio	261.54 mL/L/hr ¹	O-Thong <i>et al.</i> , 2008
Sludge	Food waste*	C/N ratio, inoculums concentration, Na ₂ HPO ₄ concentration and Endo nutrient addition	59.62 mL/g VSS/hr ²	Sreela-or <i>et al.</i> , 2011
Cow dung	Starch-containing textile wastewater	pH and substrate concentration	38.75 mL/L/hr ¹	Lay <i>et al.</i> , 2012

¹ HPR: hydrogen production rate

² SHPR: specific hydrogen production rate

*The waste was made up of rice, vegetables, fruits and meats

第五章 結論與建議

5.1 結論

經實驗證明此綠鬣蜥腸道菌群在前培養 48 小時後轉植不僅可在 96 小時內將纖維素完全降解，亦保有產氫的能力。為確保本菌群的穩定性而進行了多次的連續繼代培養。經過第四次繼代培養後已呈現穩定的狀態，平均的纖維水解速率及產氫速率分別為 0.10 g/L/hr 和 3.78 mL/L/hr。

在不同溫度下，利用綠鬣蜥腸道菌群以純纖維素為基質進行批次產氫的試驗中，在 55°C 下纖維水解產氫的能力分別為 0.17 g/L/hr 和 9.44 mL/L/hr。初始 pH 為 7 時，本菌群不僅比生長速率有最佳的表現，纖維水解的速率及產氫的速率也相當出色，分別為 0.09 hr⁻¹、0.12 g/L/hr 和 10.45 mL/L/hr。亞鐵離子濃度為 50-500 mg/L 的情況下，平均最大氫氣產量為 415 mL/L。

本實驗是以 50-65°C、pH 6-8 及亞鐵離子濃度 50-500 mg/L 進行中心混成實驗。其中，包含八個軸點設計、六個角點設計以及中心點重複六次，共計 20 組的實驗。經由中心混成實驗結果得知，綠鬣蜥腸道菌群在極端的條件下對於纖維水解產氫均造成不良影響，唯有 Run 6（極端 pH 為 8.7）以及 Run 9（極端的亞鐵離子濃度 0 mg/L）有較佳的氫氣速率表現。

經由 RSM 實驗設計之實驗結果，利用 Minitab 軟體進行分析並進行曲面圖及等高線圖之繪製後，得到最佳產氫速率培養條件：在 57.5 °C、pH 7.8 以及亞鐵離子濃度為 100 mg/L。並經由 RSM 預測之最大產氫速率為 20.19 mL/L/hr。

產氫速率最適培養條件之實驗結果中，菌體的比生長速率為 0.09 hr⁻¹，而每公升的培養基可得到 259.35 mg 的細胞乾重。纖維素降解的部分並無明顯遲滯期，其降解速率約為 0.13 g/L/hr，並且於 84 小時內完全降解。在產氫量方面，累積的最大氫氣產量為 860.64 mL/L，

而氫氣產率及產氫速率分別為 115.41 mL/g 與 19.82 mL/L/hr。

代謝產物的部分，可明顯的觀察到乙酸及乙醇的累積（乙酸大約增加了 1.5 g/L，乙醇增加了 1.2 g/L），而丁酸只有些微的增加（0.3 g/L）。因此，由代謝產物的比例來看本系統的產氫方式較偏向於乙酸的產氫代謝路徑。

5.2 建議

本研究是利用綠鬣蜥之腸道菌群進行纖維水解及產氫之實驗，經由變性梯度凝膠電泳法（DGGE）發現本菌群主要是由纖維水解菌以及產氫菌所組成。因此，在實驗上為互相配合兩菌群之需要，使得經反應曲面法（RSM）所取得的最適培養條件並不能使兩菌群分別發揮到最佳狀態。由於爬蟲類 *Iguana* 在生物演化上屬較古老原始菌種，其腸道共生菌叢或許有較古老未知之微生物種，而且目前學術界對此腸道菌群之研究較少。同時由 PCR-DGGE 結果得知此菌群中可能包含許多未被分離鑑定之微生物種，因此在未來可考慮將菌種分離、個別探討最佳反應條件後，以串連反應槽的方式使纖維水解的速率以及產氫速率及產率達到最佳化。

参考文献

- Adams, M. W., Mortenson, L. E. and Chen, J. S. (1980) Hydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 594: 105-176.
- Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I. K. and Oztekin, R. (2008) Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: effects of C/N and C/P ration hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 1813-1819.
- Askarieh, M. M., Chambers, A. V., Daniel, F. B. D., FitzGerald, P. L., Holtom, G. J., Pilkington, N. J. and Rees, J. H. (2000) The Chemical and microbial degradation of cellulose in the near field of a repository for radioactive wastes, *Waste Management*, 20: 93-106.
- Box, G. E. P. and Behnken, D. W. (1960) Some new three level design for the study of quantitative variables. *Technometrics: a journal of statistics for the physical, chemical, and engineering sciences*, 2: 455-475.
- BP Statistical Review of World Energy, June 2011.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 98 (1): 289-297.
- Das, D. and Veziroğlu, T. N. (2001) Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26: 13-28.
- Das, D. and Veziroglu, T. N. (2008) Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 6046-6057.
- Desvaux, M. (2005) *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridium. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 741-764.
- Dinamarca, C. and Bakke, R. (2011) Process parameters affecting the sustainability of fermentative hydrogen production: a short-review. *International Journal of Energy and Environment*, 2 (6): 1067-1078.

- Dubois, M, Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956)
Colorimetric method for determination of sugars and related substances.
Analytical Chemistry, 28: 350-356.
- Fan, Y. T., Xing, Y., Ma, H. C., Pan, C. M. and Hou, H. W. (2008) Enhanced
cellulose-hydrogen production from corn stalk by lesser panda manure.
International Journal of Hydrogen Energy, 33: 6058-6065.
- Fan, Y. T., Zhang, Y. H., Zhang, S. F., Hou, H. W. and Ren, B. Z. (2006a)
Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow
dung compost. *Bioresource Technology*, 97: 500-505.
- Fan, Y.T., Zhang, G. S., Guo, X. Y., Xing, Y. and Fan, M. H. (2006b)
Biohydrogen-production from beer lees biomass by cow dung compost.
Biomass and Bioenergy, 30: 493-496.
- Fangkum, A. and Reungsang, A. (2011) Biohydrogen production from
sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: Effects of initial pH and
substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36:
8687-8696.
- Frey, M.(2002)Hydrogenases: hydrogen-activating enzymes. *Chembiochem: a
European journal of chemical biology*, 3: 153-160.
- Guedon, E., Desvaux, M. and Petitdemange, H. (2002) Improvement of
cellulolytic properties of *Clostridium cellulolyticum* by metabolic
engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (1): 53-58.
- Hallenbeck, P. C. (2009) Fermentative hydrogen production: principles,
progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34:
7379-7389.
- Huang, C. Y., Patel, B. K., Mah, R. A. and Baresi, L. (1988)
Caldicellulosiruptor owensensis sp. Nov., an anaerobic, extremely
thermophilic, xylanolytic bacterium. *International Journal of Systematic
Bacteriology*, 48: 91-97.
- Hungate, R. E. (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In:

- Norris, J. R. and Ribbons, D. W., editor. *Methods in Microbiology*, volume 3B. London and New York: Academic Press. 117-132.
- Junelles, A. M., Janati-Idrissi, R., Petitdemange, H. and Gay, R. (1988) Iron effect on acetone butanol fermentation . *Current Microbiology*, 17: 299-303.
- Kalia, V. C., Lal, S., Ghai, R., Mandal, M. and Chauhan, A. (2003) Mining genomic databases to identify novel hydrogen producers. *Trends in Biotechnology*, 21 (4): 152-156.
- Karadag, D. and Puhakka, J. A. (2010) Enhancement of anaerobic hydrogen production by iron and nickel. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35: 8554-8560.
- Katherine, T. (1984) Structure and function of the digestive tract of a herbivorous lizard *Iguana iguana*. *Physiological Zoology*, 57: 1-18.
- Khan, A. W., Trottier, T.M., Patel, G. B. and Martin, S. M. (1979) Nutrient requirement for the degradation of cellulose to methane by a mixed population of anaerobes. *Journal of General Microbiology*, 112: 365-372.
- Lai, T. E., Nopharatana, A., Pullammanappallil, P. C. and Clarke, W. P. (2001) Cellulolytic activity in leachate during leach-bed anaerobic digestion of municipal solid waste, *Bioresource Technology*, 80: 205-210.
- Lay, C. H., Kuo, S. Y., Sen, B., Chen C. C., Chang, J. S. and Lin, C. Y. (2012) Fermentative biohydrogen production from starch-containing textile wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37: 2050-2057.
- Lay, J. J., Fan, K. S., Hwang, J. I., Chang, J. I. and Hsu, P. C. (2005) Factors affecting hydrogen production from food wastes by *Clostridium*-rich composts. *Journal of Environmental Engineering*, 131: 595-602.
- Lee, Y. J., Miyahara, T. and Noike, T. (2001) Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, 80: 227-231.
- Lin, C. Y. and Hung, W. C. (2008) Enhancement of fermentative hydrogen/ethanol production from cellulose using mixed anaerobic cultures.

- International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 3660-3667.
- Liu, G. Z and Shen, J. Q. (2004) Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98: 251-256.
- Mouriño, F., Akkarawongsa, R. and Weimer, P. J. (2001) Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Dairy Science*, 84: 848-859.
- Nath, K. and Das, D. (2004) Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 520-529.
- Neves, A. A., Vieira, L. M. and Menezes, J. C. (2001) Effects of preculture variability on clavulanic acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 72: 628-633.
- Ntaikou, I., Antonopoulou, G. and Lyberatos, G. (2010) Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. *Waste Biomass Valor*, 1: 21-39.
- O-Thong, S., Prasertsan, P., Intrasungka, N., Dhamwichukorn, S. and Birkeland, N. K. (2008) Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 1221-1231.
- Peguín, S. and Soucaille, P. (1995) Modulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* by iron limitation and methyl viologen addition. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 403-405.
- Peters, J. W. (1999) Structure and mechanism of iron-only hydrogenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 9: 670-675.
- Qu, X., Vavilin, V. A., Mazéas, L., Lemunier, M., Duquennoi, C., He, P. J. and Bouchez, T. (2009) Anaerobic biodegradation of cellulosic material: Batch experiments and modeling based on isotopic data and focusing on

- aceticlastic and non-aceticlastic methanogenesis. *Waste Management*, 29: 1828-1837.
- Saha, B.C. (2003) Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30: 279-291.
- Saratale, G. D., Chen, S. D., Lo, Y. C., Saratale, R. G. and Chang, J. S. (2008) Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation- a review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67: 962-979.
- Sawa, M., Tsurimaki, Y., Tsuru, T. and Shimizu, H. (1988) New quantitative method to determine protein concentration and cell number in aqueous in vivo. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 32: 132-142.
- Schoenheit, P., Brandis, A. and Thauer, R. K. (1979) Ferredoxin degradation in growing *Clostridium pasteurianum* during periods of iron deprivation. *Archives of Microbiology*, 120: 73-76.
- Sillers, R., Chow, A., Tracy, B. and Papoutsakis, E. T. (2008) Metabolic engineering of the non-sporulating, non-solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strain M5 to produce butanol without acetone demonstrate the robustness of the acid-formation pathways and the importance of electron balance. *Metabolic Engineering*, 10: 321-332.
- Sreela-or, C., Imai, T., Plangklang, P. and Reungsang, A.(2011) Optimization of key factors affecting hydrogen production from food waste by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36: 14120-14133.
- Sreela-or, C., Plangklang, P., Imai, T. and Reungsang, A.(2011) Co-digestion of food waste and sludge for hydrogen production by anaerobic mixed cultures: Statistical key factors optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36: 14227-14237.
- United Nations Environment Programme. (2009) Towards sustainable production and use of resources: Assessing Biofuels.

- Updegraff, D. M. (1969) Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry*, 32: 420-424.
- Viles, Jr. F. J. and Silverman, L. (1949) Determination of starch and cellulose with anthrone. *Analytical Chemistry*, 21: 950-953.
- Wang, J. and Wan, W. (2008a) Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 5392-5397.
- Wang, J. and Wan, W. (2008b) Effect of Fe^{2+} concentrations on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 1215-1220.
- Wang, J. and Wan, W. (2008c) Influence of Ni^{2+} concentration on biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 99: 8864-8868.
- Wang, J. and Wan, W. (2009) Experimental design methods for fermentative hydrogen production: a review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 235-244.
- Wu, X., Zhu, J., Dong, C., Miller, C., Li, Y., Wang, L. and Yao, W. (2009) Continuous biohydrogen production from liquid swine manure supplemented with glucose using an anaerobic sequencing batch reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 6636-6645.
- Yang, H. and Shen, J. (2006) Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31: 2137-2146.
- Yokoyama, H., Moriya, N., Ohmori, H., Waki, M., Ogino, A. and Tanaka, Y. (2007) Community analysis of hydrogen-producing extreme thermophilic anaerobic microflora enriched from cow manure with five substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77: 213-222.
- Yossan, S., O-Thong, S. and Prasertsan, P. (2012) Effect of initial pH nutrients and temperature on hydrogen production from palm oil mill effluent using thermotolerant consortia and corresponding microbial communities.

International Journal of Hydrogen Energy, XXX: 1-9.

Yürüm, Y. (1994) Hydrogen Production Methods. In: Yürüm, Y., editor.

Hydrogen Energy System, Utilization of Hydrogen and Future Aspects. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 15-30.

Zhang, M.L., Fan, Y. T., Xing, Y., Pan, C. M., Zhang, G. S. and Lay, J. J. (2007)

Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *Biomass and Bioenergy*, 31: 250-254.

Zhang, Y., Liu, G. and Shen, J. (2005) Hydrogen production in batch culture of

mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30: 855-860.

白明德。(1999) 厭氧生物產氫機制與程序操作策略之研究，國立成功大學環境工程學系碩士論文。

林棋能。(2002) 固定化細菌產氫。逢甲大學化學工程學系碩士班論文。

郝揆民。(2002) 紫色不含硫光合作用細菌產氫限制因子之研究。國立中興大學環境工程學系碩士論文。

張嘉修，李國興，林屏杰，吳石乙，林秋裕。(2002) 以環境生物技術生產清潔能源-氫氣。中國化學工程學會，第 49 卷，第 6 期，第 85-104 頁。

許晉榮。(2009) 運用六標準差步驟與實驗設計於半導體電子元件 PDIP 之脫層現象不良率改善，國立屏東科技大學企業管理研究所碩士論文。

葉乃菁。(2011) 以反應曲面法探討嗜熱厭氧菌 *Clostridium thermocellum* strain TCW1 產氫最適化之研究，東海大學環境科學與工程學系碩士論文。

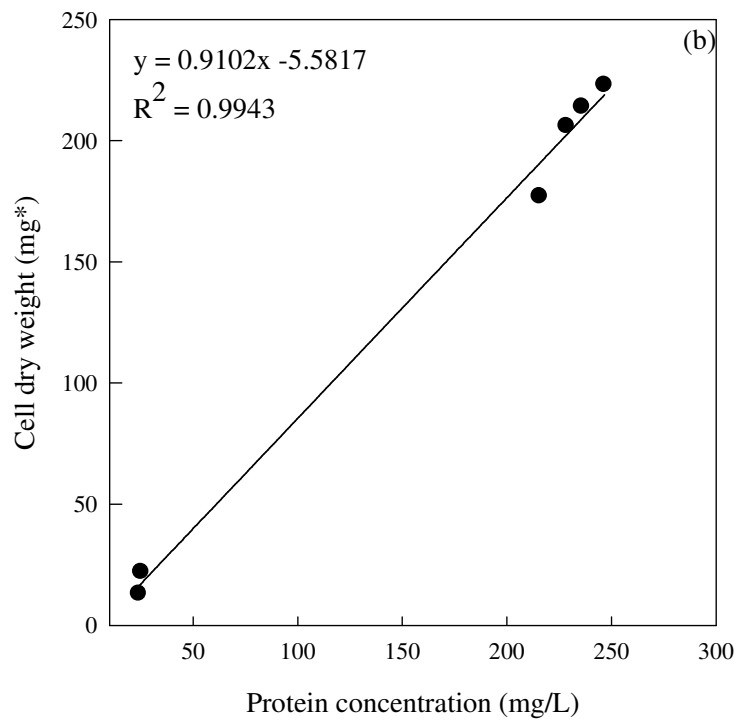
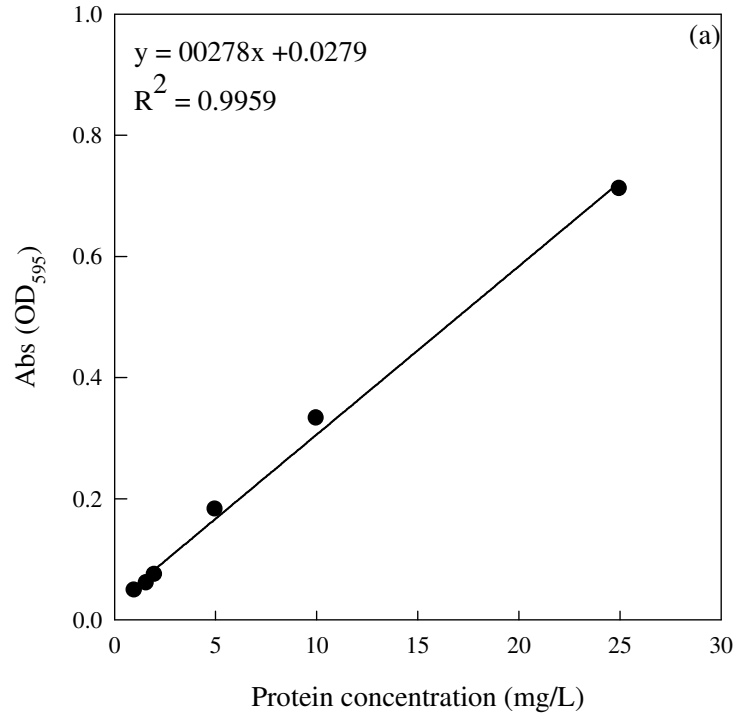
趙禹杰。(2004) 澱粉及蛋白胨複合基質厭氧醱酵產氫程序之功能評估，國立成功大學環境工程學系碩士論文。

潘龍發。(2011) 應用田口方法評量冠狀動脈攝影術中 Spider View 造影之最佳調整參數，中臺科技大學放射科學系碩士論文。

羅泳勝。(2005) 以反應曲面實驗設計法探討本土厭氧產氫菌 *Clostridium butyricum* CGS2 之最佳醱酵產氫條件，國立成功大學化學工程學系碩士論文。

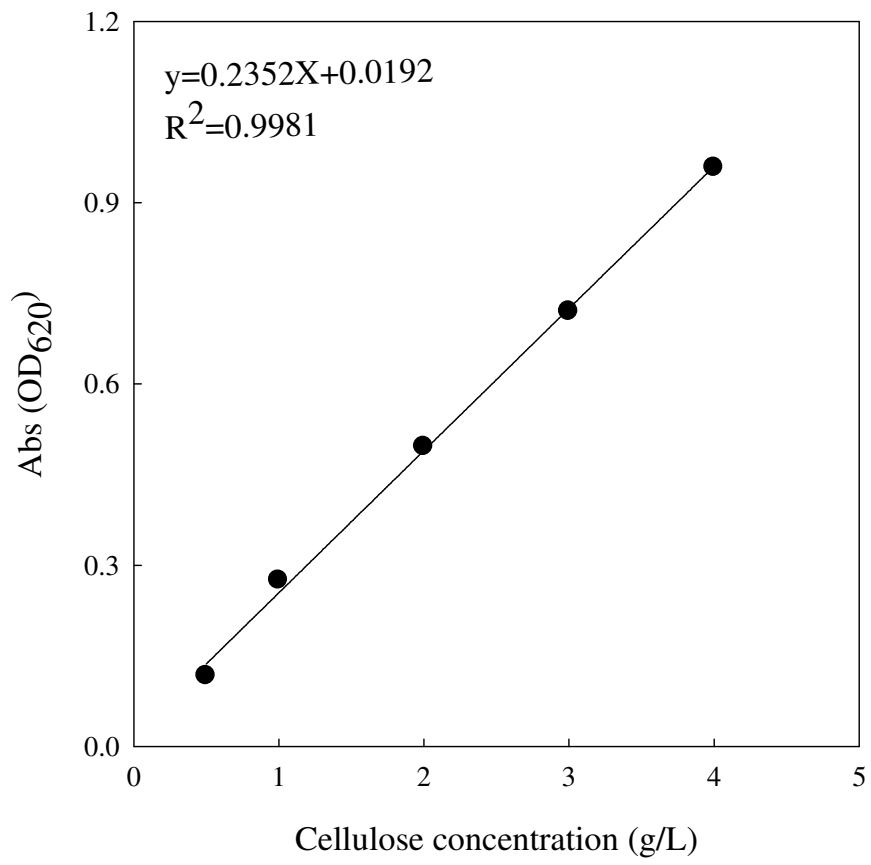
附錄

附錄一 細胞總蛋白質濃度 (a) 與細胞乾重 (b) 之檢量線

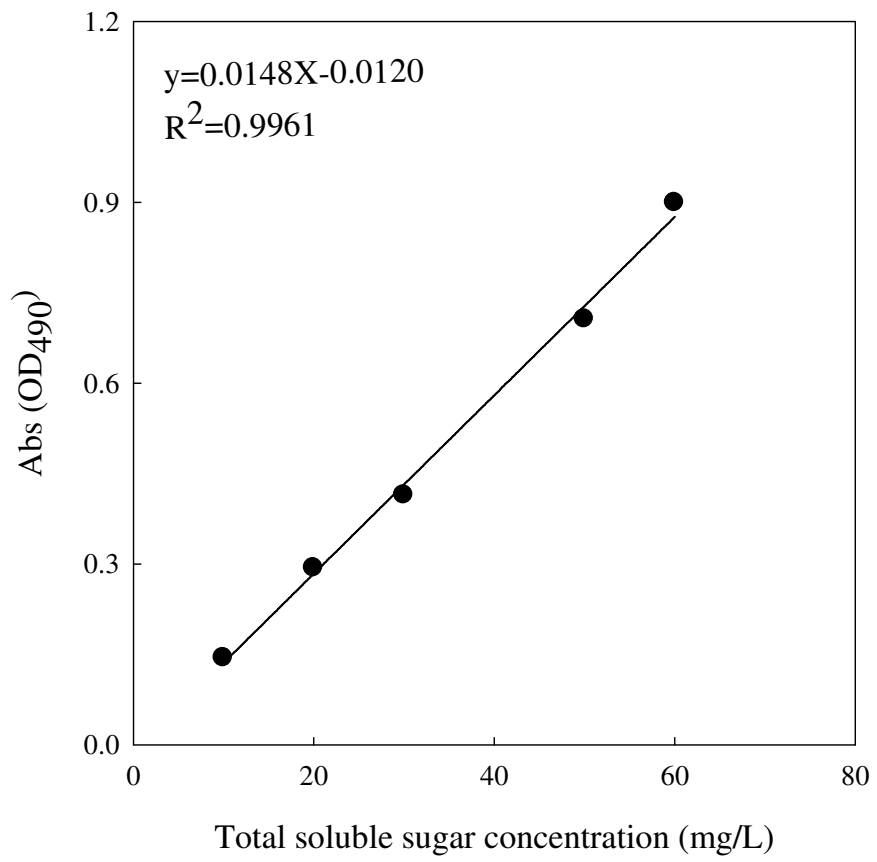


*每升的培養基在培養 20-64 hr 的細胞乾重變化

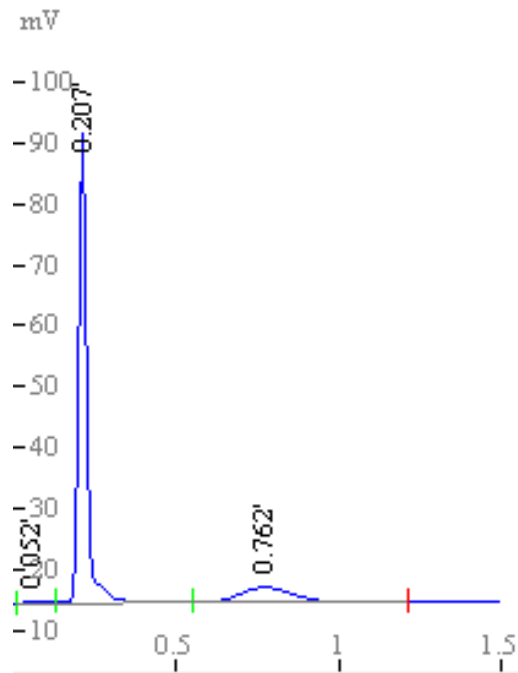
附錄二 纖維素檢量線



附錄三 總糖檢量線



附錄四 氫氣與二氧化碳標準品GC-TCD停留時間及氫氣檢量線



Retention time :

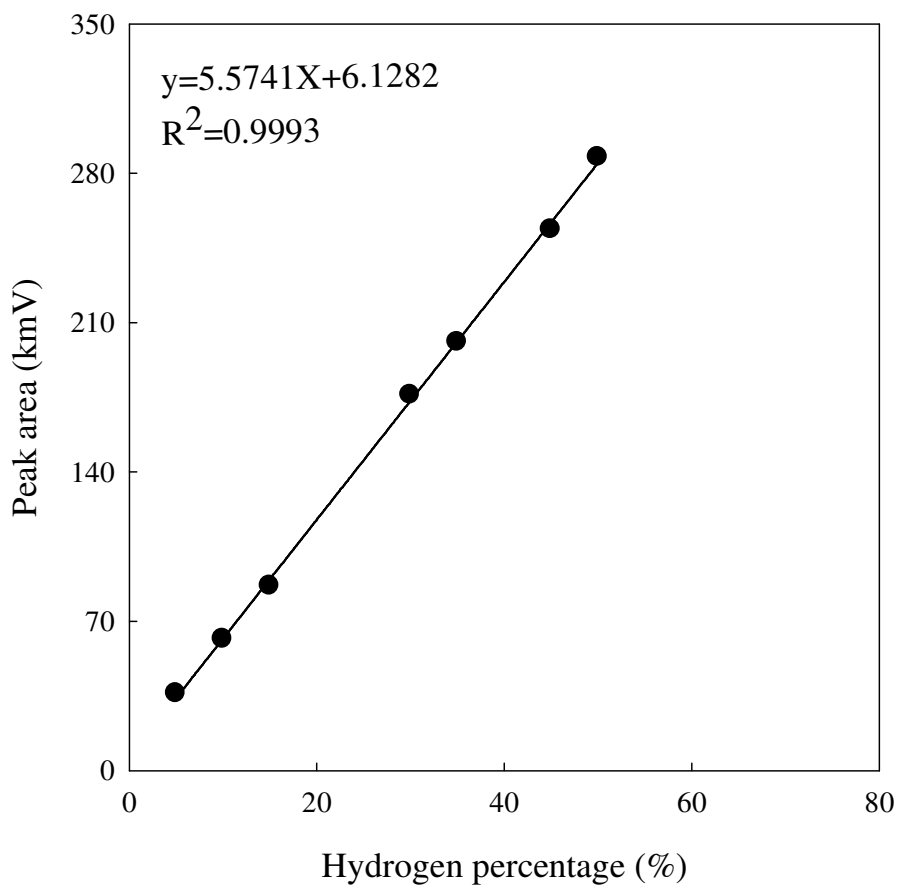
Hydrogen 0.207 min

Carbon dioxide 0.763 min

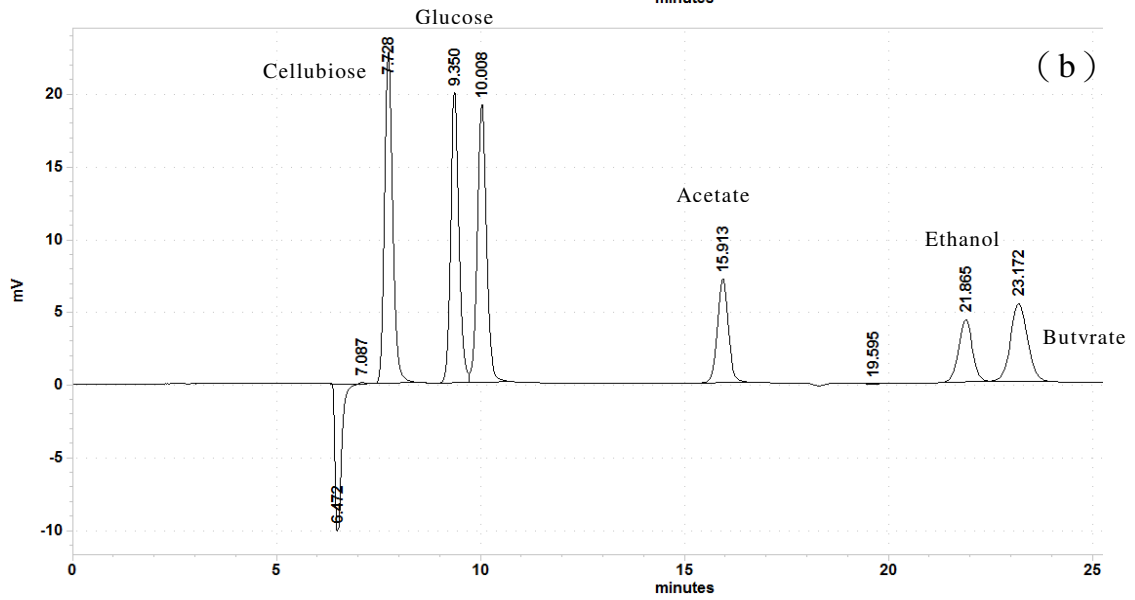
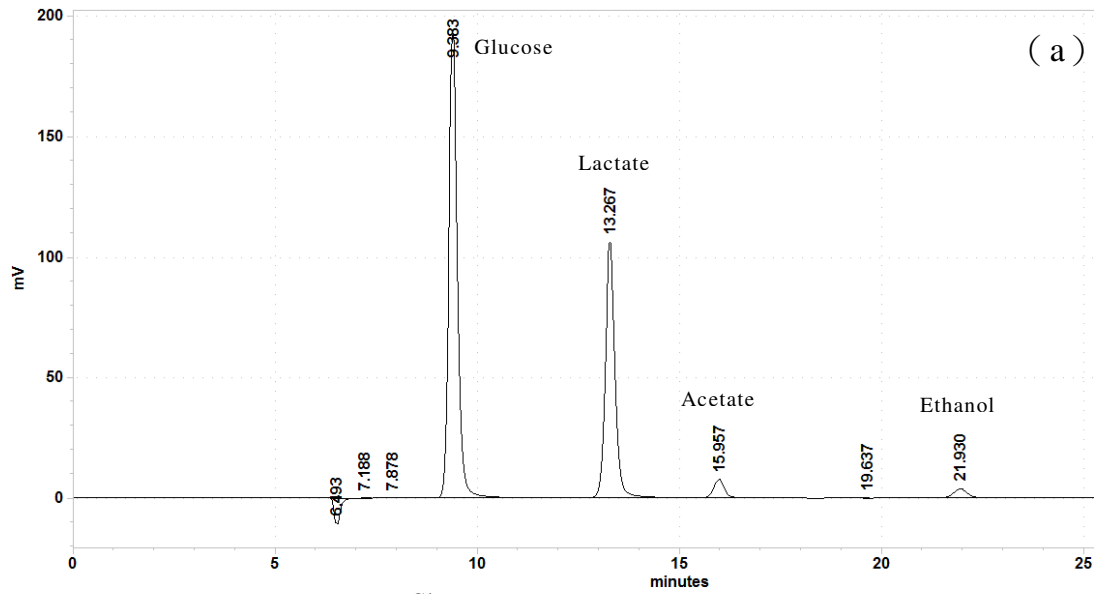
percentage :

Hydrogen 25%

Carbon dioxide 75%



附錄五 液相代謝產物標準品HPLC停留時間



(a) Standard: Glucose 1000 ppm, Lactate 100 mM, Acetate 1000 ppm and Ethanol 1000 ppm.

(b) Standard: Cellubiose 100 ppm, Glucose 100 ppm, Acetate 1000 ppm, Ethanol 1000 ppm and Butyrate 1000 ppm.

Retention time : Cellubiose 7.728 min, Glucose 9.366 ± 0.016 min, Lactate 13.267, Acetate 15.935 ± 0.022 min, Ethanol 21.897 ± 0.032 min and Butyrate 23.172 min.

附錄六 液相代謝產物標準品HPLC檢量線

