

東海大學化學工程與材料工程研究所

Graduate Institute of Chemical and Materials Engineering

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏宏偉 博士

Advisor : Hong-Wei Yen, Ph.D.

利用生質柴油同步萃取發酵液中丁醇以提高 *Clostridium*

*acetobutylicum* 丁醇產量之研究

The enhancement of butanol production by using biodiesel for

in-situ extraction in the cultivation of

*Clostridium acetobutylicum*

研究生：王義成 撰

Graduate student : Yi-Cheng Wang

中華民國 102 年 7 月

June, 2013

## 謝 誌

在念研究所的這兩年期間，讓我培養獨立思考和遇到困難或處理事情的應變能力，而這一切也將終於告一段落。首先要感謝我的指導教授—顏宏偉老師，在我的學術課業與實驗研究上的悉心指導，不斷的指點我實驗的研究方向下，論文才能夠如期完成。同時也感謝口試委員楊芳鏘教授和劉永銓教授對本論文的審閱及建議，使得本論文能更臻充實與完整，在此致上最誠摯的感謝。

在研究所的求學生涯中，感謝學長德威、凱平、阿甫、智勇、鴨子、金門、欣培、芒果、嘉豪和學姊于萱、Laco 的指導與教導。感謝金杉、儷娟、勝凱、小培、小紀，在實驗上互相幫忙、鼓勵以及生活上的關懷幫助。感謝學弟妹西瓜、毛毛、小喵、容慈、小孟、B 文、CEO、旻玉，在實驗上的幫忙與協助，為實驗室帶來歡樂與歡笑。因為有大家的陪伴，讓我在念研究所期間並不覺得孤單乏味，留下許多美好的回憶。

最後，我要特別感謝我的父母親以及家人，因為你們全力的支持，讓我在求學階段不必擔心其他因素，全心全意投入在研究上，也感謝你們的體諒與包容我因為繁忙的課業與實驗而無法與你們有多點時間相處的機會，因為有你們在背後默默地付出與支持，我才能順利完成學業。謝謝你們！

## 摘要

ABE(acetone-butanol-ethanol)發酵製程是一個歷史悠久的生物發酵製程，但是近年來生物發酵丁醇的製程卻逐漸沒落，主要原因在於丁醇的毒化抑制現象導致其低生產效率和碳源的低利用率，以及後續高純化成本，進而降低了生物發酵丁醇的商業生產競爭性。傳統上採用同步分離方法(in-situ removing)可以有效的降低丁醇的回饋抑制，但是卻會增加製程中的能源消耗。

本研究採用 liquid-liquid extraction 的分離技術，利用生質柴油當作萃取劑來同步移除發酵液內丁醇與其他代謝產物，減少丁醇抑制情形，而生質柴油所萃取得到的丁醇可以增進整體生質柴油的性質。

在搖瓶批次培養的實驗中發現，添加生質柴油並不會干擾菌體的生長，在比例測試方面以添加體積比 1:1 的生質柴油對菌體生產丁醇有最好的效果。在批次饋料中，總丁醇濃度(水相+油相)可達到 29.51 g/L，轉化率(yield)從原本(控制組)的 0.34 g/g 上升至 0.45 g/g，其葡萄糖利用率有明顯提升之趨勢。

而 5L 反應器添加生質柴油結合固定化的部分，在批次饋料實驗中，最大總丁醇生產濃度為 28.44 g/L，其 ABE 的轉化率與生產速率(productivity)分別是 0.29 g/g 和 0.38 g/L/hr。而連續式發酵實驗中，在稀釋速率(dilution rate)為 0.024 1/hr，與生質柴油替換速率為 0.012 1/hr 時，其最大總丁醇生產濃度為 175.92 g/L，ABE 轉化率與生產速率為 0.27 g/g 和 0.55 g/L/hr，與本實驗室之前的固定化連續式培養相比分別是 0.29 g/g 和 0.46 g/L/hr，其生產速率有明顯提升之趨勢。因此，可

發現以生質柴油同步移除丁醇，不但可以減少丁醇對細胞產生的抑制現象，對於

提高整體溶劑的生產速率也有明顯的助益。

關鍵字: ABE 發酵、丁醇、liquid-liquid extraction、生質柴油、連續式發酵

## **Abstract**

The acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation process continues to receive attention as a source of fuel and chemical feedstock based on renewable resources. The traditional batch fermentation process, however, suffers from various problems which impede its commercial development. End-product inhibition, low product concentration, large volumes of fermentation broth, requirement of large bioreactors, and high costs associated with generating the required steam to distill the fermentation products from broth has largely contributed to the decline in fermentative ABE production.

In-situ solvent extraction during fermentation has been shown to be one technique that enhances solvent production in ABE fermentation by reducing end-product inhibition by butanol. In this study, biodiesel was used as the in-situ extractant to reduce end product inhibition and to enhance solvent productivity for ABE fermentation, to bypass the energy intensive butanol recovery process, and to result in an ABE enriched biodiesel with improved fuel properties.

During batch operation, no significant toxicity of biodiesel on the growth of cell is observed, and its effect results the best in producing butanol when biodiesel is added at the ratios of 1:1(vol%). In the fed-batch operation, the maximum of butanol in total obtained is 29.51 g/L, the glucose utilization enhanced significantly from 0.34

to 0.45 g/g.

During fed-batch operation, scale up with adding biodiesel and immobilization, the maximum of butanol in total obtained is 28.44 g/L, the solvent productivity and yield was 0.38 g/L/hr and 0.29 g/g respectively. On the other hand, during continuous operation, the maximum of butanol in total obtained is 175.92 g/L when the dilution rate was at 0.024 and 0.012 1/hr of broth and biodiesel; the solvent productivity and yield was 0.55 g/L/hr and 0.27 g/g respectively. As compared to the previous experiment (without the addition of biodiesel) the productivity enhanced significantly from 0.46 to 0.55 g/L/hr. Therefore, the in situ removal of butanol by additions of biodiesel contains great potential for commercial usages in ABE fermentation.

**Keywords: ABE fermentation, butanol, liquid-liquid extraction, biodiesel, continuous process.**

## 目錄

摘要.....	I
目錄.....	V
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XI
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
2-1 生質能源介紹.....	3
2-2 丁醇簡介.....	4
2-3 ABE(acetone-butanol-ethanol)發酵的起源.....	7
2-3.1 微生物發酵法.....	8
2-3.2 化學合成法.....	10
2-4 菌種&基質的選擇.....	11
2-5 菌種介紹 <i>Clostridium acetobutylicum</i> .....	15
2-6 固定化介紹.....	16
2-6.1 固定化發酵生產丁醇.....	16
2-7 ABE 回收技術.....	17
2-8 Liquid-liquid extraction 簡介.....	22

2-8.1 萃取劑介紹 .....	24
2-9 分離技術之能源消耗 .....	29
2-10 生質柴油簡介 .....	30
第三章 實驗材料與方法 .....	35
3-1 實驗材料 .....	35
3-1.1 實驗菌株 .....	35
3-1.2 實驗藥品 .....	35
3-1.3 實驗儀器 .....	37
3-2 分析方法 .....	38
3-2.1 Biomass 分析方法 .....	38
3-2.2 葡萄糖分析方法 .....	38
3-2.3 發酵液中 ABE(Acetone-Butanol-Ethanol)濃度測量方法 .....	39
3-2.4 生質柴油中丁醇濃度測量方法 .....	40
3-3 實驗方法 .....	41
3-3.1 菌種保存 .....	41
3-3.2 菌種活化 .....	41
3-3.3 種菌培養基(Seed Medium, SM) .....	42
3-3.4 發酵培養基(Fermentation Medium, FM) .....	43
3-3.5 接菌 .....	44

3-3.6	生質柴油的製備 .....	45
3-4	實驗架構 .....	46
3-5	實驗步驟 .....	47
3-5.1	生質柴油添加的時間點與比例之選擇 .....	47
3-5.2	添加生質柴油之時間曲線變化 .....	47
3-5.3	搖瓶批次饋料發酵程序 .....	48
3-5.4	5L 反應器批次饋料發酵程序 .....	48
3-5.5	5L 反應器批次饋料(連續進料)發酵程序 .....	49
3-5.6	5L 反應器重複批次饋料(Repeated Fed-batch)發酵程序 .....	49
3-5.7	5L 反應器連續式(Continuous)發酵程序 .....	50
第四章	結果與討論 .....	52
4-1	添加生質柴油於發酵液中之時間點與添加量之探討 .....	52
4-2	添加生質柴油之時間曲線變化 .....	56
4-3	搖瓶批次饋料實驗 .....	59
4-4	5 L 反應器批次饋料實驗 .....	61
4-5	5 L 反應器批次饋料(連續進料)實驗 .....	63
4-6	5 L 反應器重複批次饋料(Repeated Fed-batch)實驗 .....	65
4-7	5 L 反應器連續式(Continuous)發酵實驗 .....	67
第五章	結論與未來展望 .....	72

5-1 結論 .....	72
5-2 未來展望 .....	73
參考文獻.....	74
附錄.....	81
附錄 1: 生質柴油與添加 10 g/L 丁醇的生質柴油在 3°C 和 6°C 的環境中之雲化情形.....	81
附錄 2: 菌體乾重(biomass)檢量線.....	84
附錄 3: 丙酮(acetone)檢量線.....	85
附錄 4: 乙醇(ethanol)檢量線.....	85
附錄 5: 丁醇(butanol)檢量線.....	86
附錄 6: 油相丁醇(butanol)檢量線.....	86
簡 歷.....	87

## 圖目錄

圖 2-1	Metabolic pathways in <i>C. acetobutylicum</i> .....	9
圖 2-2	化學合成丁醇反應式.....	10
圖 2-3	<i>C. acetobutylicum</i> 在 SEM 下的影像 .....	14
圖 2-4	Liquid-liquid extraction 示意圖 .....	19
圖 2-5	不同分離技術對丁醇回收所耗的能量.....	26
圖 2-6	三酸甘油酯之轉酯化反應.....	28
圖 2-7	利用鹼催化生產生質柴油之流程圖.....	30
圖 2-8	利用酸催化反應生產生質柴油之流程圖.....	30
圖 3-1	生質柴油.....	41
圖 3-2	實驗架構.....	42
圖 3-3	連續式發酵設備簡圖.....	47
圖 3-4	連續式發酵設備圖.....	47
圖 4-1	不同時間點添加不同比例的生質柴油其總丁醇生產量之情形.....	50
圖 4-2	丁醇在水相和油相中的萃取速率.....	51
圖 4-3	丁酸在水相和油相中的萃取速率.....	51
圖 4-4	添加生質柴油(1:1)與控制組之總丁醇濃度和葡萄糖消耗量之時間曲線 .....	53

圖 4-5	添加生質柴油(1:1)與控制組之生物量和 pH 之時間曲線 .....	53
圖 4-6	添加 1:1 生質柴油其批次與批次饋料之比較.....	55
圖 4-7	添加 1:1 生質柴油之批次饋料中水相和油相的丁醇濃度.....	55
圖 4-8	5L 反應器批次饋料對 <i>C. acetobutylicum</i> 生長之影響 .....	57
圖 4-9	5L 反應器批次饋料其 ABE 在水相和丁醇在油相中的各別濃度 .....	57
圖 4-10	5L 反應器批次饋料(連續進料)對 <i>C. acetobutylicum</i> 生長之影響 ....	59
圖 4-11	5L 反應器批次饋料(連續進料)其 ABE 在水相和丁醇在油相中的各別 濃度.....	59
圖 4-12	5L 反應器重複批次饋料對 <i>C. acetobutylicum</i> 生長之影響 .....	61
圖 4-13	5L 反應器重複批次饋料其 ABE 在水相和丁醇在油相中的各別濃度 .....	61
圖 4-14	5L 反應器連續式發酵對 <i>C. acetobutylicum</i> 生長之影響 .....	63

## 表目錄

表 2-1	丁醇異構物的分子結構和主要應用.....	5
表 2-2	醇類和傳統石化燃料之特性.....	6
表 2-3	四種菌種的比較分析.....	12
表 2-4	比較不同種 <i>Clastridium</i> 利用可溶物殼物幹酒糟(DDGS)的水解產物中 各種醣類的情形.....	13
表 2-5	ABE 產物回收技術.....	17
表 2-6	一些常見萃取劑的毒性和分配系數.....	21
表 2-7	ABE 在生質柴油中的分配系數.....	23
表 2-8	添加 ABE 跟無添加 ABE 之生質柴油性質比較表.....	23
表 2-9	所有植物油之生質柴油特性.....	25
表 3-1	實驗藥品清單.....	31
表 3-2	實驗儀器清單.....	33
表 3-3	種菌培養基 (seed medium, SM) .....	38
表 3-4	發酵培養基 (fermentation medium, FM) .....	39
表 3-5	Mineral salt solution 組成.....	40
表 4-1	不同時間點添加不同比例的生質柴油其水相和油相中丁醇濃度.....	50
表 4-2	不同發酵方法結合不同移除技術之 ABE 的 productivity 和 yield 比較表	



## 第一章 緒論

近年來隨著非再生能源如石油、天然氣等因為人口極速增加，導致消耗量和價格也在不斷攀升，但其蘊藏量卻在日益萎縮，再加上使用這些非再生能源後，伴隨而來的環境污染問題如溫室效應、空氣汙染和氣候變遷等，這些都是當前必須改善的，因此除了要節約能源之外，發展再生能源(包括太陽能、生質能、風能、地熱及水力)將是未來全球追求永續能源發展的重要課題之一。

其中乙醇發酵生產的技術成熟且實用性高，因此受到相當多的矚目，但由於乙醇具有強烈的吸水性，導致使用純乙醇作為燃料上容易造成油箱因吸收水氣而產生燃燒不完全的現象。相較於極性較高的乙醇，含四個碳的丁醇 (butanol)，其碳數是乙醇的兩倍，每單位所含的能量較高，跟乙醇相比可多產生 25% 的能量；由於丁醇的碳鏈較長，極性較低，性質比乙醇更接近汽油，因此使用添加高比率丁醇的混合汽油燃料時，車輛的引擎系統可不必作變動，同時丁醇的腐蝕性相對的也比乙醇低，因此可直接利用現有的管線輸送到加油站；此外，丁醇在轉換能量後，產物只有二氧化碳和水，不會產生有害環境的副產品。

使用厭氧菌 *Clostridium acetobutylicum* 進行 ABE(Acetone-Butanol-Ethanol) 發酵製程是一個熟為人知的生物發酵製程，但是此製程的困難在於高單價基質所帶來的低經濟競爭性，以及產物本身具有嚴重的抑制效應，丁醇濃度只要有 1% 就會抑制細胞生長，進而導致後段分離純化丁醇的高耗能結果。

很多方法已被應用於生物發酵製程中，藉此不斷移除發酵液中的丁醇，減少抑制效應並提高產率，包括 pervaporation、liquid-liquid extraction、gas stripping、Adsorption、perstraction 等。其中本實驗使用 liquid-liquid extraction 的方法，利用生質柴油當作萃取劑(extractant)，來同步移除發酵液內丁醇以及其他代謝產物，期望有效的降低丁醇抑制情形，進而提高丁醇的產量與生產速率。

## 第二章 文獻回顧

### 2-1 生質能源介紹

根據一份研究報告指出，在 2007 年全球能源主要來自石油(34%)、煤(26.5%)、天然氣(20.9%)、生質能源(9.8%)與核能(5.9%)，其他能源(包括太陽能、水力、風力、地熱與潮汐等)大約占 2.9%。事實上，全球的總運輸消耗量大約只有 2% 是來自生物量(biomass)生產的生物燃料，因此，將生質能源應用在交通運輸和其他一些能源供應設施上仍有很大的潛力在(Jin et al., 2011)。

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

## 2-2 丁醇簡介

丁醇為四個碳原子所組成的醇類，可分為四種不同異構物，正丁醇(n-butanol)、仲丁醇(sec-butanol)、異丁醇(iso-butanol)、叔丁醇(tert-butanol)，微生物發酵所生產的丁醇為正丁醇(以下簡稱 butanol)，butanol 為澄清液體，具有臭味，可溶於醇、醚類及其他有機溶劑中，且微溶於水，為精細化工中的原料；分子式  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ，分子量 74.12 g/mol，在 1 atm 下沸點 117.73 °C、閃點 37 °C，在 25 °C 下的溶解度 9.1 mL/100 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ，分子結構如表 2-1 所示。

丁醇為重要的有機化學原料，主要用途為做植物油、生物鹼、有機染料和印刷油墨之溶劑，它可以溶解油類、樹脂、蠟質等，也用於生產鄰苯二甲酸二丁酯 (Dibutyl phthalate, DBP)、鄰苯二甲酸苯基丁酯 (Phenyl-butyl phthalate, BBP) 等增塑劑及醋酸丁酯、丙烯酸丁酯等化學品；除了在塗料、製藥、化妝品、有機合成和塑膠工業等方面有著廣泛的應用外，丁醇亦可做為醫療上殺菌，現今更被視為熱門的生質燃料(表 2-1) (Durre,2007)。

作為生質燃料方面，由於丁醇與汽油的混合比高，故無需對車輛進行改造，就可使用濃度幾乎 100%的丁醇做為燃料；且與同屬醇類燃料的乙醇 (ethanol) 相比，其優越的性質，如能源含量高、揮發性低、對水的溶解度與吸收度低，使丁醇被歸為優於乙醇的替代能源。表 2-2 為醇類和傳統石化燃料之特性。

表 2-1 丁醇異構物的分子結構和主要應用(Jin et al., 2011)

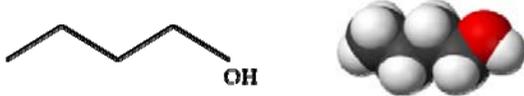
丁醇異構物	分子結構示意圖	主要應用
1-Butanol		<p>溶劑 – 用於塗料、樹脂、染料等。            增塑劑 – 改善塑膠材料流程            化學中間體 – 丁基酯或丁基醚等。            化妝品- 包括眼妝和口紅等。            汽油添加劑。</p>
2-Butanol		<p>化學中間體 – 例如丁酮等。            工業清潔劑 – 去除油漆。            香水或是人工香精。</p>
iso-Butanol		<p>溶劑和塗料添加劑            汽油添加劑            工業清潔劑 – 去除油漆            油墨成分</p>
tert-Butanol		<p>溶劑            乙醇變性劑            工業清潔劑 – 去除油漆            汽油添加劑對於辛烷值助推器和氧化。            MTBE、ETBE、TBHP 的中間體。</p>

表 2-2 醇類和傳統石化燃料之特性(Jin et al., 2011)

	汽油	柴油	甲醇	乙醇	丁醇
分子式	C <sub>4</sub> -C <sub>12</sub>	C <sub>12</sub> -C <sub>25</sub>	CH <sub>3</sub> OH	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH
十六烷值	0-10	40-55	3	8	25
辛烷值	80-99	20-30	111	108	96
含氧量(% weight)	-	-	50	34.8	21.6
密度(g/mL) at 20°C	0.72-0.78	0.82-0.86	0.796	0.79	0.808
自燃溫度(°C)	~300	~210	470	434	385
閃火點 (°C) at closed up	-45 to-38	65-88	12	8	35
最低熱值(MJ/kg)	42.7	42.5	19.9	26.8	33.1
沸點(°C)	25-215	180-370	64.5	78.4	117.7
化學劑量比	14.7	14.3	6.49	9.02	11.2
潛熱 (kJ/kg) at 25°C	380-500	270	1109	904	582
可燃性限制(% vol.)	0.6-8	1.5-7.6	6.0-36.5	4.3-19	1.4-11.2
飽和壓力( kPa) at 38°C	31.01	1.86	31.69	13.8	2.27
動力黏度(mm <sup>2</sup> /s) at 40°C	0.4-0.8( 20°C)	1.9-4.1	0.59	1.08	2.63

### 2-3 ABE(acetone-butanol-ethanol)發酵的起源

利用微生物發酵法生產丁醇於 1861 年由 Pasteur 發表後，各地的學者們開始研究與探討。Weizmann 於研究合成橡膠的過程中，發現丁醇或異戊醇是重要的化學合成中間物，在 1912~1914 年間，他對一些菌株進行分離和研究，後來命名為 *Clostridium acetobutylicum*，然而當時科學家利用 *C. acetobutylicum* 發酵主要是用來生產丙酮，丁醇被認為只是副產物而已。1914 年中期，第一次世界大戰爆發，英國軍隊需要用丙酮作為纖維素膠體來製作無煙火藥，但當時丙酮大都從德國和奧地利進口，因此面臨嚴重短缺的問題，而就在 1915 年間，英國政府和 Weizmann 簽署契約，利用 *C. acetobutylicum* 發酵生產丙酮供應英國政府所需，到 1918 年後期戰爭結束這段期間，共生產了 3000 噸的丙酮和 6000 噸的丁醇。而直到 1927 年，丁醇才被確認是這個發酵程序的主產物，丙酮只是副產品而已。1960 年代，由於石化合成技術的迅速發展，且發酵法生產所需的原料成本高、程序複雜和產物不易回收等因素，導致微生物發酵法逐漸被較具經濟效應的化學合成法取代，微生物發酵法生產丁醇的研究漸漸不受重視而停滯，僅剩南非、蘇聯等國因受到國際禁運而缺乏石油，仍持續維持進行發酵製程。1973 年能源危機發生，隨著石油資源日益緊缺造成原油價格竄升，各地開始紛紛投入利用可再生資源來取代石油原料的研究，使微生物發酵丁醇(ABE)之研究再次興起(Jones and Woods, 1986)。

### 2-3.1 微生物發酵法

利用微生物發酵過程來生產丁醇的發酵製成又稱為 ABE 發酵，即利用菌株 *C. acetobutylicum* 生產 A—丙酮(acetone)、B—丁醇(butanol)和 E—乙醇(ethanol)。厭氧菌 *C. acetobutylicum* 的代謝路徑如圖 2-1 所示，主要依其生成之產物不同而分為兩個階段。首先，於發酵前期 *C. acetobutylicum* 利用 glucose 經由 glycolysis 路徑產生 pyruvate，再經由 pyruvate 生成大量的有機酸包括 acetate、butyrate、lactate 等，產酸的過程中同時會釋放出 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>，由於產生大量的有機酸進而導致此階段發酵液的 pH 值會有迅速下降之趨勢，因此，將此階段稱之為產酸期 (acidogenic phase)。

當有機酸含量超過一定值，尤其是在 butyric acid 濃度大於 2 g/L 且 pH 值下降至低於 5 時，便開始進入發酵後期的溶劑生產期(solventogenic phase)，此時期主要代謝路徑是先藉由 acetoacetyl-CoA 轉變成 acetone 之反應途徑，促使前發酵產物 acetic acid、butyric acid 還原成 acetyl-CoA 及 butyryl-CoA 並經由 acetoacetate decarboxylase 產出丙酮，acetyl-CoA 經由 acetaldehyde dehydrogenase 和 alcohol dehydrogenase(ADH)得到乙醇，進一步利用 butyraldehyde dehydrogenase (BYDH) 和 butanol dehydrogenase (BDH)之催化，讓中間產物 butyryl-CoA 還原成主產物丁醇。(Bahl et al., 1982)

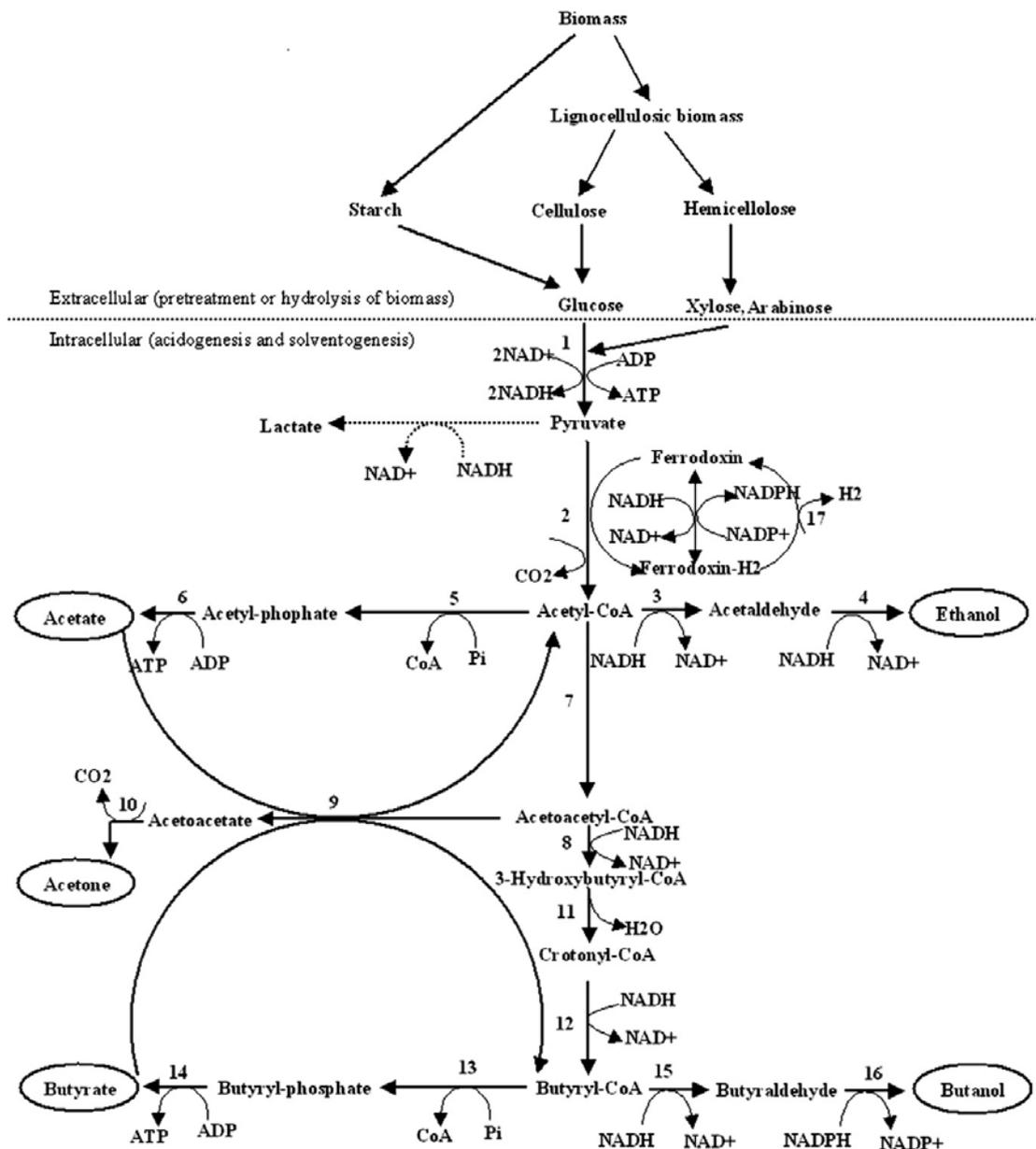


圖 2-1 Metabolic pathways in *C. acetobutylicum* for the acidogenic and solventogenic phase. Enzymes are indicated by numbers as follows: (1) enzymes including in glycolysis process (2) pyruvate-ferredoxinoxidoreductase; (3) acetaldehyde dehydrogenase; (4) ethanol dehydrogenase; (5) phosphate acetyltransferase (phosphotransacetylase); (6) acetate kinase; (7) thiolase (acetyl-CoA acetyltransferase); (8) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; (9) acetoacetyl-CoA: acetate/butyrate:CoA-transferase; (10) acetoacetate decarboxylase; (11) crotonase; (12) butyryl-CoA dehydrogenase; (13) phosphate butyltransferase (phosphotransbutyrylase); (14) butyrate kinase; (15) butyraldehyde dehydrogenase; (16) butanol dehydrogenase; (17) hydrogenase. (Kumar et al., 2011)



圖2-2 化學合成丁醇反應式 (a) Oxo synthesis ; (b) Reppe process ; (c) crotonaldehyde hydrogenation

## 2-4 菌種&基質的選擇

所有梭菌菌株經過詳細的分類和系統發育研究，目前工業上的梭狀芽孢桿菌之間分為四個品種，即 *C. acetobutylicum*、*C. beijerinckii* (以前是 *C. butylicum*)、*C. saccharoperbutylacetonicum* 和 *C. saccharobutylicum*。Shaheen 等人利用不同的基質來進行研究，比較這四個主要品種(含不同菌株)，其基質分為兩種，有糖蜜(含 6%可發酵糖)和玉米糊狀物培養基，結果如表 2-3 所示，從表中可得知不同品系菌株對基質依賴的性質。Shaheen 等人的結論是跟糖蜜相比，*C. acetobutylicum* 更適合以澱粉為主的基質，而 *C. saccharobutylicum* 則適合以糖蜜當作培養基，*C. saccharoperbutylacetonicum* 對於兩種培養基其產量都有適中的表現，對於菌種 *C. beijerinckii*，只有 NRRL B592 菌株對於兩種培養基都有表現出良好的性質。(Shaheen et al., 2000)

另一個研究是使用可溶物的穀物幹酒糟(Distillers Dried Grains with Soluble，簡稱 DDGS)的水解產物當作培養基，比較不同菌株生產 ABE 溶劑的情形。DDGS 水解產物的主要成分有己糖(葡萄糖、甘露糖、半乳糖和果糖)、戊糖(木糖和樹膠醛糖)還有蛋白質、脂肪、油和木質素。表 2-4 為使用不同菌株和混合糖進行批次發酵的結果，其中，混合糖裏的葡萄糖、甘露糖、樹膠醛糖和木糖的比例為 25:5:10:20 g/L。(Blaschek and Ezeji., 1995)

表 2-3 四種菌種的比較分析(Shaheen et al., 2000)

Microbial strain	Maize medium 6%		Molasses mash medium	
	concentration (g/L)	ABE solvent yield	concentration (g/L)	ABE solvent yield
<i>C. acetobutylicum</i>				
NCIMB 619	19.6	24.5	7.8	13
ATCC 824	19.2	24	9.5	15.8
DSM 1732 or NCIMB 2951	17.9	22.4	4.1	6.8
<i>C. saccharobutylicum</i>				
NCP P262	11.3	14.1	17.9	29.8
NCP P258	10.8	13.5	18.3	30.5
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>				
N1-4	14.2	17.8	4.9	8.2
N1-504	10.8	13.5	18.3	30.5
<i>C. beijerinckii</i>				
NRRL B592	16.2	20.8	11.1	18.5
NCP P260	11.3	14	18.9	31.5
NRRL B593	14.1	17.6	11.5	19.2

表 2-4 比較不同種 *Clastridium* 利用可溶物穀物幹酒糟(DDGS)的水解產物中各種醣類的情形\*

Microbial culture	Fermentation time (hr)	Solvent production (g/L)				Sugar utilization G:M:A:X	Preference
		A	B	E	Total		
<i>C. acetobutylicum</i> 260	48	6.3	13.2	0.8	20.3	100:100:92:71	G>M>A>X
<i>C. acetobutylicum</i> 824	96	4.7	13.1	0.6	18.4	100:100:60:80	G>M>X>A
<i>C. saccharobutylicum</i> 262	72	3.2	10.4	0.7	14.3	74:38:63:42	G>A>X>M
<i>C. butylicum</i> NRRL 502	60	6.7	12.5	0.5	19.7	100:100:89:86	G>M>A>X
<i>C. beijerinckii</i> 8032	60	3.4	10.5	0.7	14.6	81:42:49:64	G>X>A>M
<i>C. beijerinckii</i> BA101**	84	3.5	13.9	0.5	18.0	100:54:65:78	G>X>A>M

\*Blaschek and Ezeji., 1995

\*\*Chen and Blaschek., 1999



## 2-5 菌種介紹 *Clostridium acetobutylicum*

*C. acetobutylicum* 為革蘭氏陽性菌 (Gram-positive)，於 1974 年被 Smith 和 Hobbs 所提出，因此菌株可產生 acetone 和 butyl alcohol 而命名之。外觀上呈直桿狀且具移動性，細胞周圍有鞭毛，屬於典型的絕對厭氧菌。一般存在於土壤、人和牛的排泄物、汗水、湖裡的沉積物和蛤的內臟，適合生長的溫度為 15-69°C，而在 pH 值為 6.5-7 及溫度 30-37°C 的環境中生長較快。

由於能將多種碳氫化合物經發酵轉成 Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) 和 H<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub> 而獲得學者們巨大的興趣，但也因產物丁醇 (butanol) 達 10-16 g/L 時會對 *Clostridium* 產生毒化作用，使得研究陷入一定的瓶頸。而現今已發展至可透過 adsorption、gas stripping、liquid-liquid extraction、reverse osmosis、perstraction 和 pervaporation 等方式，移除培養基中的丁醇以達成高產量之目標。(Qureshi et al., 1995)

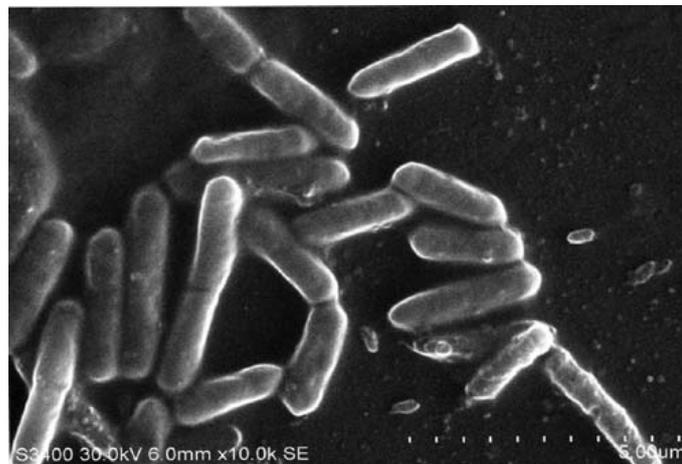


圖 2-3 *C. acetobutylicum* 在 SEM 下的影像(Ni et al., 2009)

## 2-6 固定化介紹

固定化微生物技術是利用化學或物理程序將懸浮微生物封閉或限制於某一特定的空間區域內，使微生物在反覆連續操作的條件下仍能保持活性，維持較高的細胞濃度及加快生產速度，即藉由人工的方式將懸浮微生物固定或限制在固態載體（carriers）中，使微生物由隨機移動狀態轉變成固定狀態。相較於懸浮微生物的反應系統，由於有載體的保護，固定化微生物較不易受外界環境的影響，且固定化微生物可以重複使用，延長微生物的使用時間以及維持操作系統的穩定性（吳, 2007）。因此，固定化微生物具有微生物密度高、反應速度快、抗污能力強、微生物流失少、產物容易分離和處理設備小等優點。

### 2-6.1 固定化發酵生產丁醇

固定化發酵生產丁醇常用的固定化方法為吸附法與包埋法。吸附法為一種簡易的技術，可直接於反應槽中進行吸附作用，且不需經由化學反應以達到固定化的成效，降低固定化對微生物的傷害，吸附法常用的載體皆為成本較低廉之載體。使用固定化發酵製程，能使 *C. acetobutylicum* 有較高的 ABE 生產速率和反應系統的穩定性。平均結果顯示固定化發酵 ABE 生產速率可達 0.3-0.5 g/L/hr，比傳統非固定化之生產速率 0.1-0.3 g/L/hr 高。故由於吸附法的簡易技術、高 ABE 生產速率、高穩定性與低成本，使得吸附法較易被應用於放大（scale-up）規模

中。(Qureshi et al., 2004)

## 2-7 ABE 回收技術

由於 *C. acetobutylicum* 在發酵的過程中會因為發酵液中丁醇濃度過高(10~16 g/L)，對細胞產生毒化作用，進而導致低生產速率(productivity)和低轉化率(yield)的情形，而目前最顯著的解決辦法是利用同步(in situ)移除技術來移除發酵液內的 ABE 溶劑，以保護細胞受到毒化抑制。這方面的技術已被許多研究團隊做很多深入的研究，除了傳統的蒸餾程序，一般常見的如：pervaporation (Qureshi and Blaschek 2000; Qureshi et al. 2001)、adsorption (Qureshi et al. 2005)、liquid-liquid extraction (Groot et al. 1990; Qureshi and Maddox 1995)、gas stripping (Maddox et al. 1995; Qureshi and Blaschek 2001a; Ezeji et al. 2003, 2004)、reverse osmosis (Garcia et al. 1986)和 perstraction (Grobben et al. 1993; Qureshi and Maddox. 2005)等，其它們的原理和優、缺點都整理在表 2-5 中。



表2-5 ABE產物回收技術(Dürre.,1998)

Method	Principle	Advantage	Disadvantage
Adsorption	利用溶劑的黏附 如: 沸石、離子交換樹脂 和熱再生		材料較格較高，低容量、 低選擇性，有結垢的可能
Gas stripping	熱提液，通入氣體將將水 或揮發性溶劑帶出	操作簡單，堵塞或結垢的 機會低	低選擇性，無法完全移除 溶劑，跟薄膜做基礎相比 ，能量需求更高
Liquid/liquid extraction	利用與水不互溶的溶劑跟 發酵液接觸，再利用蒸餾 回收溶於溶劑中的丙酮、 丁醇或異丙醇	高容量、高選擇性，堵塞 或結垢的機會低	操作昂貴，可能有乳狀液 形成
Membrane evaporation	利用溶劑通過多孔膜的選 擇性擴散，應用真空或冷 凝技術將揮發的溶劑回收	跟滲透蒸發相比其薄膜面 積要求較小，且操作容易	有堵塞或結垢的可能

Method	Principle	Advantage	Disadvantage
Perstraction	類似liquid/liquid extraction，利用薄膜分離發酵液和萃取劑	高選擇性、操作簡單	所需的薄膜面積較大，有堵塞或結垢的可能
Pervaporation	利用溶劑通過一個非多孔薄膜的選擇性擴散，應用真空技術將揮發的溶劑回收	跟薄膜蒸發相比其選擇性較高，且操作容易	跟薄膜蒸發相比其薄膜通量較低，且有堵塞或結垢的可能，
Reverse osmosis	利用半滲透膜進行高壓分離，將稀釋的溶液分離成濃縮液跟純水，使濃縮液淨化	比傳統蒸餾花費成本更低	有堵塞或結垢的可能



## 2-8 Liquid-liquid extraction 簡介

對於從發酵液中移除溶劑而言，Liquid-liquid extraction是另一種高效率的回收技術，它的原理是將萃取劑與發酵液混合，利用欲萃取物在兩相間不同的相溶性來移除發酵液內的產物，效率方面取決於丁醇在萃取劑與發酵液中不同的分配系數(distribution coefficients)，雖然丁醇具有極性，但因為它具有四個碳之碳鏈，可以產生很好的疏水效應，因此相對於溶於發酵液(水相)中，它更傾向溶於萃取劑(extractant)，也就是有機相。但是，它仍有一些關鍵的問題存在，像是萃取劑會不會對細胞產生毒害和乳化形成(emulsion formation)，這些問題是可以克服的，如挑選不會對細胞產生毒害的萃取劑或是在發酵液和萃取劑中間添加一個特殊材質的薄膜，使兩種不能混合的溶液分離，並提供丁醇有一個交換的表面積，這被稱為perstraction (Ezeji et al., 2007a)。

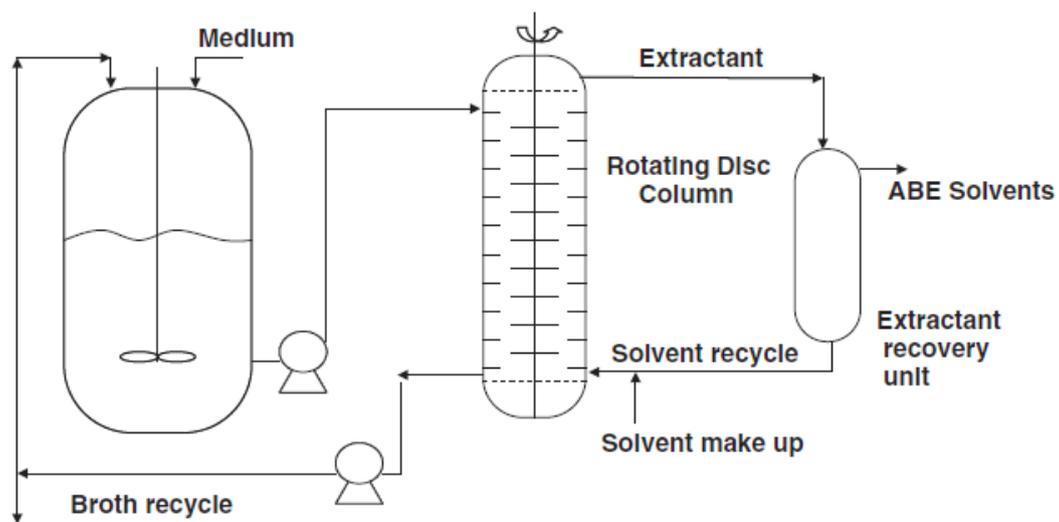


圖2-4 Liquid-liquid extraction 示意圖(Groot et al., 1992)

液-液萃取的效率關鍵在萃取劑，因此選擇一個好的萃取劑除了不能對細胞產生毒化作用外，還要考慮兩個重要的指標，即分配系數(distribution coefficients)和選擇率(selectivity)。分配系數越高表示該萃取物相對於在發酵液中，它更傾向溶於萃取劑，移除效率也就越好，而選擇率越高表示萃取劑優先萃取該萃取物。

(1) 分配系數(distribution coefficients)

$$K = \frac{C_E}{C_B}$$

其中  $K$  為分配系數，無單位， $C_E$  為分析物在有機相的濃度(kg/L)， $C_B$  為分析物在水相的濃度(kg/L) (Groot et al. 1990)。

(2) 選擇率(selectivity)

$$S = \frac{K_B}{K_W}$$

其中  $S$  為選擇率， $K_B$  為丁醇的分配系數， $K_W$  為水相中所有溶劑的分配系數 (Groot et al. 1990)。

## 2-8.1 萃取劑介紹

為了提高萃取過程中萃取劑的丁醇濃度，一些溶劑已被確認且測試它們在發酵過程中對丁醇的選擇性(selectivity)和生物相容性(Shukla et al., 1988; Job et al., 1989)。在這些溶劑當中，油醇(oleyl alcohol) (Qureshi and Maddox, 1995; Davison and Thompson, 1993)、癸醇(decanol) (Evans and Wang, 1988)、鄰苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate) (Qureshi and Maddox, 1995)和聚丙二醇(polypropylene glycol) (Barton and Daugulis, 1992)已被廣泛使用在實驗室作原位溶劑萃取。甲基毛棕櫚油(Methylated crude palm oil) (Ishizaki et al., 1999)和甲基化葵花籽油(methylated sunflower oil) (Grobber et al., 1993)也已經成功研究被拿來作丁醇的萃取劑，以維持發酵液中低的丁醇濃度。而本實驗是利用生質柴油(biodiesel)當作萃取劑。

表 2-6 一些常見萃取劑的毒性和分配系數

Extractant	Toxicity <sup>a</sup>	Partition coefficient <sup>b</sup>
Hexanol	Toxic	9.91–12
Octanol	Toxic	7.33–10
Decanol	Toxic	6.2–8
Oleyl alcohol	Nontoxic	3.21–4
Castor oil	Nontoxic	2–6
Corn oil	Nontoxic	0.6–0.7
Hexadecane	Nontoxic	0.148
Kerosene	Nontoxic	0.127

<sup>a</sup>對 *C. acetobutylicum* 和 *C. beijerinckii* 的培養

<sup>b</sup>Karcher et al. (2005), Evans et al. (1988), and Groot et al. (1990)

本實驗之所以利用生質柴油當作萃取劑，除了因為柴油本身不會對細胞產生毒化之外，最重要的是生質柴油在萃取完後即是產品，可直接拿來當作引擎燃料，不必再經過任何純化的過程，節省能源的開銷。已有學者利用生質柴油來移除 *C. acetobutylicum* 發酵液中的 ABE，從表 2-7 中可發現生質柴油優先萃取丁醇 (butanol)，減少產物抑制，而整體丁醇濃度從原本的 11.6 g/L 提升到 16.5 g/L，其整體 ABE 濃度從 20 g/L 上升到 29.9 g/L，分別提升 42% 和 50%。含有 ABE 的生質柴油經過分析後發現其本身的性質也有所提升，結果如表 2-8 所示，十六烷值 (cetane number) 從 48 提升到 54，冷濾點 (cold filter plugging point, CFFP) 從原本 5.8°C 降到 0.2°C，因此，可證實在 ABE 發酵過程中添加生質柴油當作萃取劑，不但可以提升 ABE 的產量以及省略昂貴的純化費用，還可以連帶提升生質柴油本身的性質 (Li et al., 2010)。

表 2-7 ABE 在生質柴油中的分配系數(Li et al., 2010)

Products	Partition coefficient <sup>a</sup>
Acetone	0.19
Ethanol	0.16
Butanol	1.23
Acetic acid	0.22
Butyric acid	1.62

<sup>a</sup>分配系數的算法是在萃取劑與發酵液相混合的情況下，將生質柴油中產物的濃度除以發酵液中產物的濃度，其操作過程是將 50 mL 的生質柴油與 100 mL 包含 2 g 的丁醇、1 g 的丙酮、0.5 g 的乙醇、0.2 g 乙酸和 0.5 g 丁酸的發酵液相混合，在 30°C 的培養環境中培養 24 小時。

表 2-8 添加 ABE 跟無添加 ABE 之生質柴油性質比較表(Li et al., 2010)

Fuel property	Biodiesel	ABE-enriched biodiesel
Water and sediment	0.03	0.05
CFPP <sup>a</sup>	5.8	0.2
Kinematic viscosity, 40°C	4.2	3.1
Flash point	140	95
Sulfated ash	0.019	0.012
Cetane number	48	54
Carbon residue	0.055	0.043
Acid number	0.75	0.37
Phosphorus content	0.003	0.003

Fuel properties were tested based on the procedures of the American Society of Testing and Materials(ASTM)

### <sup>a</sup>CFPP cold filter plugging point

十六烷值(CN)被作為評價柴油自燃性的指標，用來測量引擎點火的難易度和燃燒的流暢度，作為柴油品質之參數。為有效規範燃料級之生質柴油品質，目前已有之標準，包括歐洲之 EN14214：2003 (E) 與美國之 ASTM D6751，前者為歐洲地區用以規範使用於柴油引擎之生質柴油之品質要求與測試方法，後者為美國用以規範生質柴油之國家標準。十六烷值是指與所測柴油自燃性相當的標準燃料中所含正構十六烷烴的體積百分數。標準燃料是用正十六烷(n-cetane)與  $\alpha$ -甲基萘(a-methylnaphthalene)按不同體積百分數配成的混合物(Ramos et al., 2009)。十六烷值越高，代表點火延緩時間越點，引擎容易啟動，且可以降低硫化物、一氧化碳和碳氫化合物的排放量，若十六烷值越低，則引擎著火慢，工作不穩定，容易有震爆的情形發生(Meher et al., 2006)。

冷濾點是衡量輕柴油低溫性能重要指標，能夠反映柴油低溫實際使用性能，其定義是指在規定條件下，當試油通過過濾器每分鐘不足 20 mL 時的最高溫度(Ramos et al., 2009)。當冷濾點越低時，表示抗凍效果越好，越不容易被雲化。一般而言，石化柴油的冷濾點約為 $-15^{\circ}\text{C}$ ，除了極冷的地區外都可以使用，而一般廢食用油的冷濾點約為 $5\sim 9^{\circ}\text{C}$ ，棕櫚油更高達 $11^{\circ}\text{C}$ ，也就是說，若將這些油直接加入引擎中，就有可能因為溫度太低導致油凝固而無法使用，因此，用戶在選用柴油時，應同時兼顧當地氣溫對於柴油冷濾點的影響，表 2-9 為利用植物油轉變成生質柴油的性質比較表。(附錄 1 為生質柴油與添加 10 g/L 丁醇的生質柴油在 $3^{\circ}\text{C}$ 和 $6^{\circ}\text{C}$ 的環境中之雲化情形。)

表 2-9 所有植物油之生質柴油特性(Ramos et al., 2009)

性質	單位	棕櫚	橄欖	花生	油菜籽	大豆	向日葵	葡萄籽	杏仁	玉米
酯含量	wt.%	97.7	99	99.5	99.5	96.9	97.2	97.8	99.7	99.8
動力黏度 (40°C)	mm <sup>2</sup> /s	4.5	4.5	4.6	4.4	4.2	4.2	4.1	4.2	4.4
閃火點	°C	176	178	176	170	171	177	175	172	170
十六烷值	—	61	57	53	55	49	50	48	57	53
CFFP	°C	10	-6	17	-10	-5	-3	-6	-6	-12

## 2-9 分離技術之能源消耗

選擇節能的分離技術應用在丁醇回收，對於未來在工業上應用具有相當大的競爭力。因此，將不同分離技術對於丁醇回收的能源需求進行評估，這些技術包括：蒸餾(steam stripping distillation)、氣提(gas stripping)、吸附(adsorption)、滲透蒸發(pervaporation)和液-液相萃取(liquid-liquid extraction)。其不同分離技術對丁醇回收能耗比較的結果如圖 2-4 所示(Qureshi et al., 2005)。

從圖 2-5 可以發現，在分離過程中所選用的蒸餾和氣提所耗費的能源較高，其次是滲透蒸發，而本實驗所用之方法也就是萃取法其能源消耗相對低的，這對未來應用在商業化具有很大的優勢。

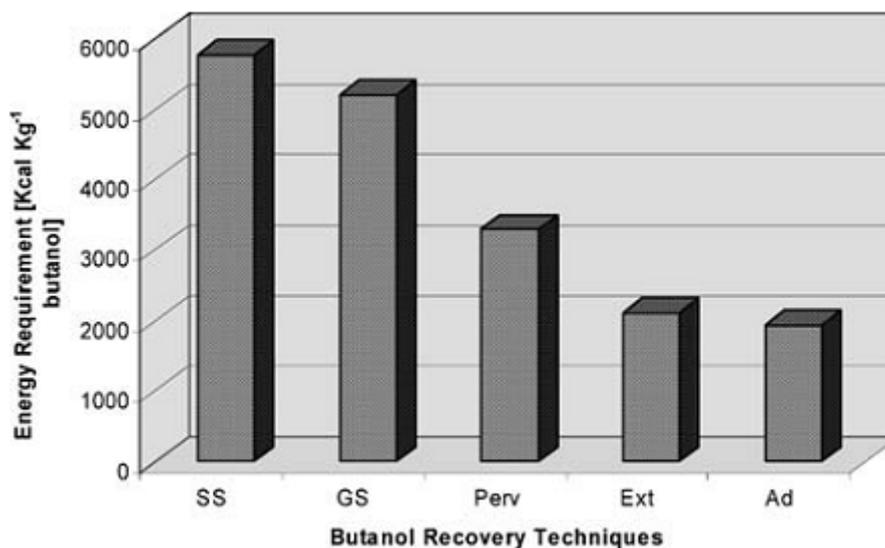


圖 2-5 不同分離技術對丁醇回收所耗的能量(Qureshi et al., 2005)

SS —steam stripping distillation，GS —gas stripping，Perv—perva-poration，  
Ext—liquid-liquid extraction，Ad —adsorption on to silicalite

## 2-10 生質柴油簡介

生質柴油(Biodiesel)又稱生物柴油，是一種潔淨之替代燃料，它主要是從天然植物油、動物脂肪、油脂純化副產物與食用或工業回收廢油提煉得來，因不含石化成分，且可以獨自或與石化柴油混合使用於既有或稍作些許修改之柴油引擎，是一種使用方便、無毒、具生物可分解性(biodegradable)之燃料。

生質柴油主要的優點是在作為生質燃料與石化衍生物的柴油燃料相比，其二氧化碳(CO<sub>2</sub>)的排放量減少78%，因為它的結構不含芳香族(aromatic)，可以燃燒更完全，其一氧化碳(CO)的排放量減少46.7%，顆粒排放(particulate emissions)也減少66.7%，未燃燒完的煙類也減少45.2%，因此，它可以被應用在一個高敏感度的環境中(Helwani et al., 2009)。除此之外，因為它含有較高的沸點(約150°C)和脂肪酸，使其具有一個較低的揮發度(volatility)和提高潤滑的效果，在作為燃料時將減少引擎的磨損和提高使用壽命(Al-Zuhair., 2007)。

其油的來源有植物油如：棕櫚(palm)、油菜籽(rapeseed)、大豆(soybean)、蓖麻(castor)和麻瘋樹(jatropha)等，而動物油則有豬油和其他動物殘留脂肪等，研究中發現棕櫚油產量最高，約每公頃可生產4000 kg棕櫚油，為生產生質柴油中最佳的油料來源(Al-Zuhair., 2007)。

影響生質柴油轉化率的參數主要有溫度、油/醇的比例、游離脂肪酸(FFA)和水分含量，隨著溫度提高其轉化率也會上升，而最適合的溫度範圍在60-70°C。

轉酯化(Transesterification)是目前工業上最常用來生產生質柴油的方法，因為它具有轉化率較高與反應時間較短等優點，此方法是將油脂、醇類在某一比例下進行反應，生成酯類的過程。其中，為了加速反應之速度與產物之生成，常加入催化劑(catalyst)，包括酸性催化劑(acid catalyst)、鹼性催化劑(alkali catalyst)、異質催化劑(heterogeneous catalyst)、解脂酵素(lipase)，圖2-6為三酸甘油酯之轉酯化反應，其油/醇的莫耳數比為1:3。

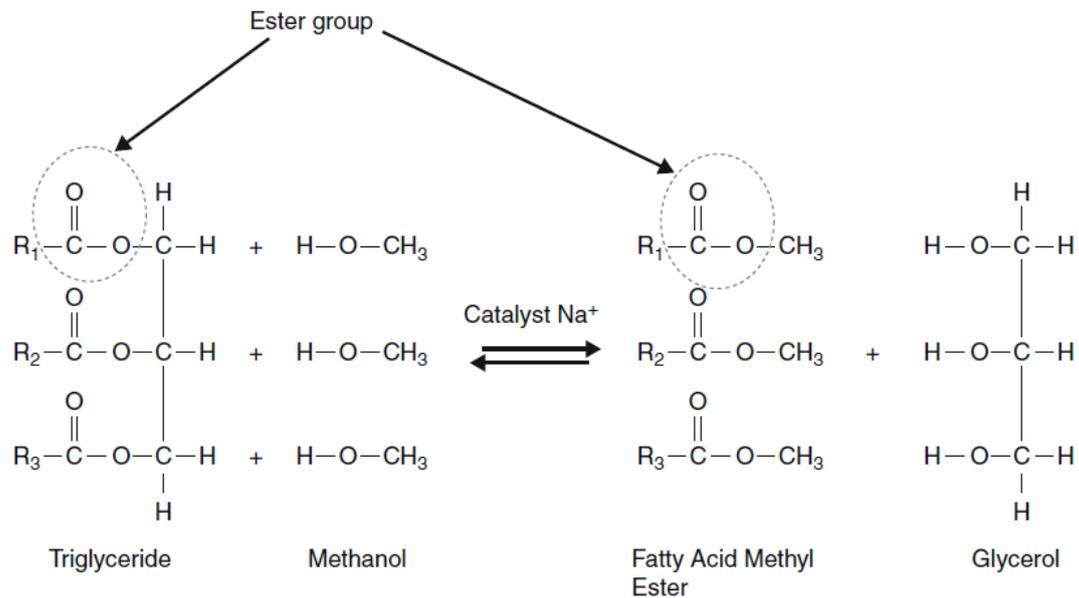


圖2-6 三酸甘油酯之轉酯化反應

圖 2-7 為鹼催化轉酯生成生質柴油的流程圖，在含有甲醇(methanol)的情況下轉換為脂肪酸甲基酯(fatty acid methyl esters, FAME)和副產物甘油(glycerin)，而圖 2-8 則為酸催化轉酯的流程圖(Schuchardt et al., 1998)。含低含量游離脂肪酸(free fatty acid, FFA)的油適合拿來當鹼催化轉酯的原料，而高含量的 FFA 則適合用在酸催化反應，游離脂肪酸的存在會使在鹼催化的過程中容易形成皂化和乳化反應，阻礙生質柴油的純化過程(Basu et al., 1996)。鹼性的甲醇鹽類如氫氧化鉀(KOH)和氫氧化鈉(NaOH)是使生質柴油具有高產量的鹼性催化劑，即使濃度很低，其所需反應的時間也很短(Helwani et al., 2009)。另一方面，酸催化反應的時間比鹼催化反應慢了 400 倍，對游離脂肪酸的含量也較不敏感，而油中水的存在也會導致催化劑衰退，使轉化率降低(Al-Zuhair., 2007)。

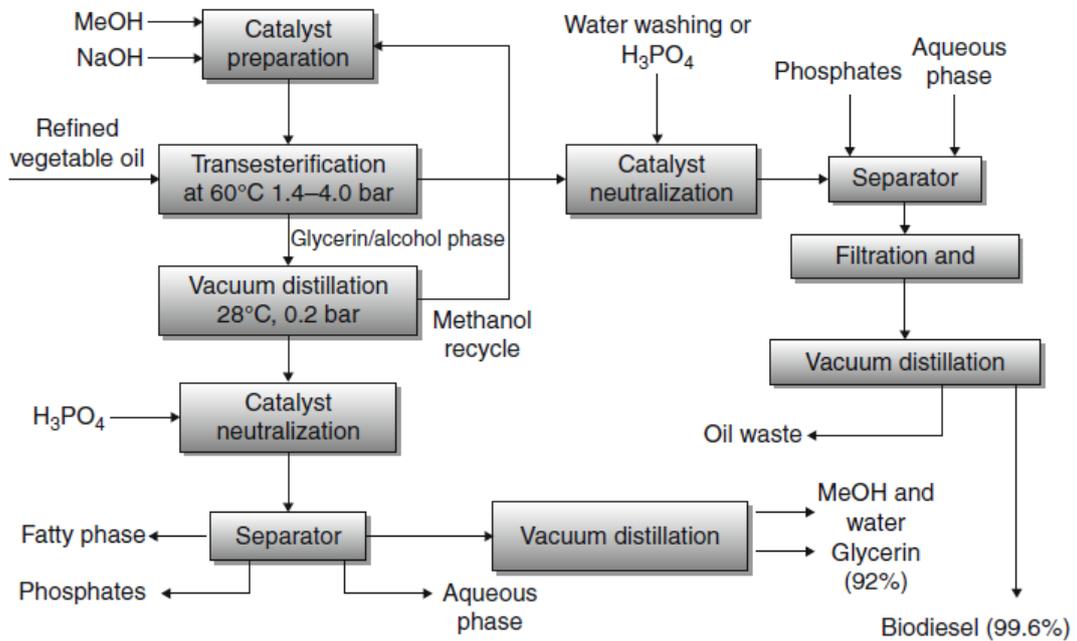


圖 2-7 利用鹼催化生產生質柴油之流程圖(Helwani et al., 2009)

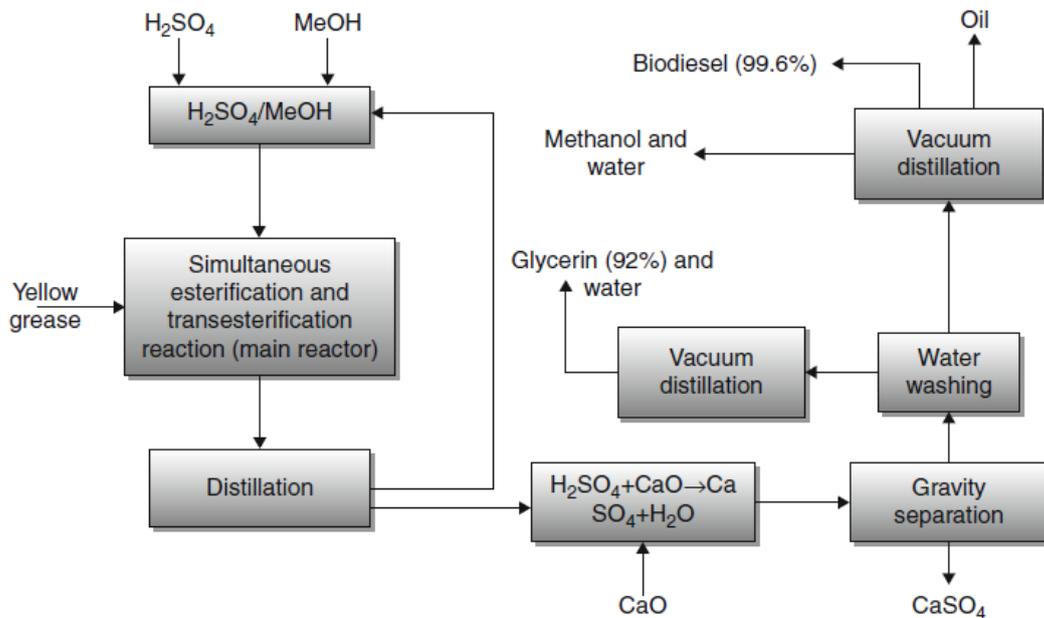


圖 2-8 利用酸催化反應生產生質柴油之流程圖(Helwani et al., 2009)



### 第三章 實驗材料與方法

#### 3-1 實驗材料

##### 3-1.1 實驗菌株

本實驗所採用的菌株 *Clostridium acetobutylicum*，是購自生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center)，菌種編號：BCRC10639。

##### 3-1.2 實驗藥品

表 3-1 實驗藥品清單

中文名	英文名	廠牌
胰化蛋白胨	Tryptone	DIFCO BD
酵母萃取物	Yeast Extract	DIFCO BD
鉬酸鈉	Sodium molybdate dehydrate	昭和化學株式會社
硫酸	Sulfuric acid	SHOWA
硫酸鈉	Sodium sulfate	聯工化學試藥
硫酸銅	Cupric sulfate	SHOWA
硫酸錳	Manganese sulfate monohydrate	Scharlau
硫酸鎂	Magnesium sulfate heptahydrate	SHOWA
硫酸鋅	Zinc sulfate heptahydrate	SHOWA
磷酸氫二鉀	Dipotassium hydrogenphosphate	SHOWA
對氨基苯甲酸	p-aminobenzoic acid	ACROS
生物素	Biotin	SIGMA
氯化鈣	Calcium dichloride dihydrate	聯工化學試藥
氯化鈷	Cobalt dichloride hexahydrate	Hanawa
氯化鐵	Ferric chloride	SHOWA

醋酸	Acetic acid	SHOWA
丁酸	Butyric acid	ACROS
丙酮	Acetone	TEDIA
乙醇	Ethanol	ECHO
丁醇	Butanol	ACROS
正己烷	n-Hexane	SHOWA
鹽酸	Hydrochloric acid	Scharlau
氫氧化鈉	Sodium Hydroxide	SHOWA
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
甘油	Glycerol	SHOWA
RCM	Reinforced clostridial medium	DIFCO BD
生質柴油	Biodiesel	又華股份有限公司

---

### 3-1.3 實驗儀器

表 3-2 實驗儀器清單

儀器設備	型號	廠牌
pH meter	PH-206	Lutron
電子天平	BJ 100M	Precisa
磁石攪拌加熱器	MS-3205B	ChromTech
高壓蒸氣滅菌釜	EA635	TRIDENT
無菌操作台	3BH-24	HIGH TEN
超純水製造機	Simplicity	MILLIPORE
微電腦蒸餾水製造機	WSC044	FIDTREM
加熱反應器	CR 2200	Weilheim
恆溫震盪培養箱	LUS-150	LIAN SHEN
微量離心機	MCD-2000	HSIANGTAI
高速中型離心機	Universal-32R	Hettich
試管震盪器	MS1 minishaker	IKA
超音波震盪器	DC300H	DECTA
分光光度計	GENESYS 10UV	Thermo
葡萄糖分析儀	2300STAT	YSI
氣相層析儀	Focus GC	Thermo
烘箱	LO-150	LIAN SHEN
5 L 液態發酵槽	BTF-A 5L	頂生
蠕動泵浦	Masterflex L/S Drives 07553-75	Cole-Parmer
低溫恆溫水槽	CRC-30L	PROYES

## 3-2 分析方法

### 3-2.1 Biomass 分析方法

離心管秤重，取不同濃度之菌液分別置入離心管中，經由離心機以轉速 9,000 rpm 離心 10 min 後，分離菌體和上清液。去除上清液，將菌體和離心管一同進入烘箱烘乾後秤重，測得菌體乾重 (Dry cell weight, DCW)。取不同濃度之菌液，利用分光光度計在波長 620 nm 下測量光學密度 (Optical density, O.D.)。依不同濃度所測得的 DCW 和 O.D. 值作圖，獲得檢量線： $DCW(g/l)=(O.D.-0.0258)/0.6796$  (附錄 2)。

### 3-2.2 葡萄糖分析方法

將發酵液以離心機離心(9000 rpm, 5 min)，分離菌體和上清液。取上清液，利用 YSI 2300STAT Glucose analyzer 來進行量測。

### 3-2.3 發酵液中 ABE(Acetone-Butanol-Ethanol)濃度測量方法

取菌液至離心管中，經由離心機以轉速 9000 rpm 離心 10 min 後，分離菌體和上清液。取上清液並用 Filter 過濾，利用氣相層析儀 (Thermo model Focus GC series) 來量測。毛細管柱為 SEG BP20 (25 m×0.22 mm×0.25 μm)，起始溫度 120 °C，維持 3 min 後以 16°C/min 之速率升溫至 200°C，維持 5 min；注射孔(injector)，溫度 200°C；偵測器為火焰離子偵測器 (FID detector)，溫度 250°C；運送氣體 (carrier gas) 為氮氣 (nitrogen)，流量 25 ml/min。注射上清液體積為 1μL。

波峰面積和代謝產物濃度作圖，獲得檢量線：

丙酮(acetone)檢量線方程式： $\text{Concentration(g/L)}=\text{area}/602178$  (附錄 3)

乙醇(ethanol)檢量線方程式： $\text{Concentration(g/L)}=\text{area}/497086$  (附錄 4)

丁醇(butanol)檢量線方程式： $\text{Concentration(g/L)}=\text{area}/990559$  (附錄 5)

### 3-2.4 生質柴油中丁醇濃度測量方法

把含有 ABE 的生質柴油置於離心管中，經由離心機以轉速 9000 rpm 離心 10 min 後，把多餘的雜質跟菌體分離。取上面的油相，使用正己烷(hexane)當作溶劑，將生質柴油溶於其中，利用氣相層析儀(Thermo model Focus GC series)來進行量測。毛細管柱為 SEG BP20 (25 m×0.22 mm×0.25 μm)，起始溫度 120°C，維持 3 min 後，以 16°C/min 之速率升溫至 200°C，維持 2 min，之後再以 10°C/min 之速率升溫至 230°C，維持 30 min；注射孔 (injector)，溫度 230°C；偵測器為火焰離子偵測器 (FID detector)，溫度 230°C；運送氣體 (carrier gas) 為氮氣 (nitrogen)，流量 25 ml/min。注射上清液體積為 1μL。

波峰面積和代謝產物濃度作圖，獲得檢量線：

丁醇(butanol)檢量線方程式： $\text{Concentration(g/L)} = \text{area}/1160954$  (附錄 6)

### 3-3 實驗方法

#### 3-3.1 菌種保存

購自生物資源保存及研究中心，編號 BCRC10639 的 *C. acetobutylicum* 之冷凍乾燥管，接入種瓶培養基活化，置入含厭氧產氣包的厭氧罐，於恆溫震盪培養箱中，以 37°C 培養 30 小時。取 0.8 mL 菌液和 0.2 mL 甘油置入微量離心管中混合均勻，通入含有 50% CO<sub>2</sub> 和 50% N<sub>2</sub> 之混合氣體後，放入 -20°C 冰箱冷凍保存。

#### 3-3.2 菌種活化

取保存於 -20°C 冰箱內冷凍保存的種菌，利用加熱反應器加熱至 70°C 活化菌體 2 min 後，接種至種瓶培養基，置入含厭氧產氣包的厭氧罐，於恆溫震盪培養箱中，以 37°C 培養 30 小時。

### 3-3.3 種菌培養基(Seed Medium, SM)

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

表 3-3 種菌培養基 (seed medium, SM)

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

### 3-3.4 發酵培養基(Fermentation Medium, FM)

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

表 3-4 發酵培養基 (fermentation medium, FM)

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

表 3-5 為無機鹽溶液 (Mineral salt solution) 的組成比例。為發酵培養基中之成分-Mineral salt solution。

表 3-5 Mineral salt solution 組成

Compounds	Concentration (g/L)
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.24
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.24
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.5
FeCl <sub>3</sub>	16.203
CuSO <sub>4</sub>	0.1598
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5164
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.7
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	24.574
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (6M)	28 mL

### 3-3.5 接菌

將活化後 SM 之玻璃試管與滅菌後 FM 發酵槽以 75 %酒精噴灑，置入無菌操作台。取 100mL SM 加至 5L 反應器後，放置發酵反應器上，通入混合氣體(50 % CO<sub>2</sub> 和 50% N<sub>2</sub>)並以恆溫水槽控制溫度為 37 °C

### 3-3.6 生質柴油的製備

研究中搖瓶實驗所使用的生質柴油為本實驗自製，利用鹼催化轉酯而得，其製作過程為 100g 的大豆沙拉油，加入等比例的甲醇(methanol)，其醇油比(%wt)為 15%，氫氧化鈉 0.5g，轉速為 500rpm，在 70°C 溫度下反應 2 小時後，靜置冷卻 30 分後可發現分層現象，上層為生質柴油，下層為副產物也就是甘油(glycerol)，圖 3-1 為轉酯完後的生質柴油。在 5L 反應器方面，由於生質柴油的使用量較大，所以直接向又華股份有限公司購買取得。



圖 3-1 生質柴油

### 3-4 實驗架構

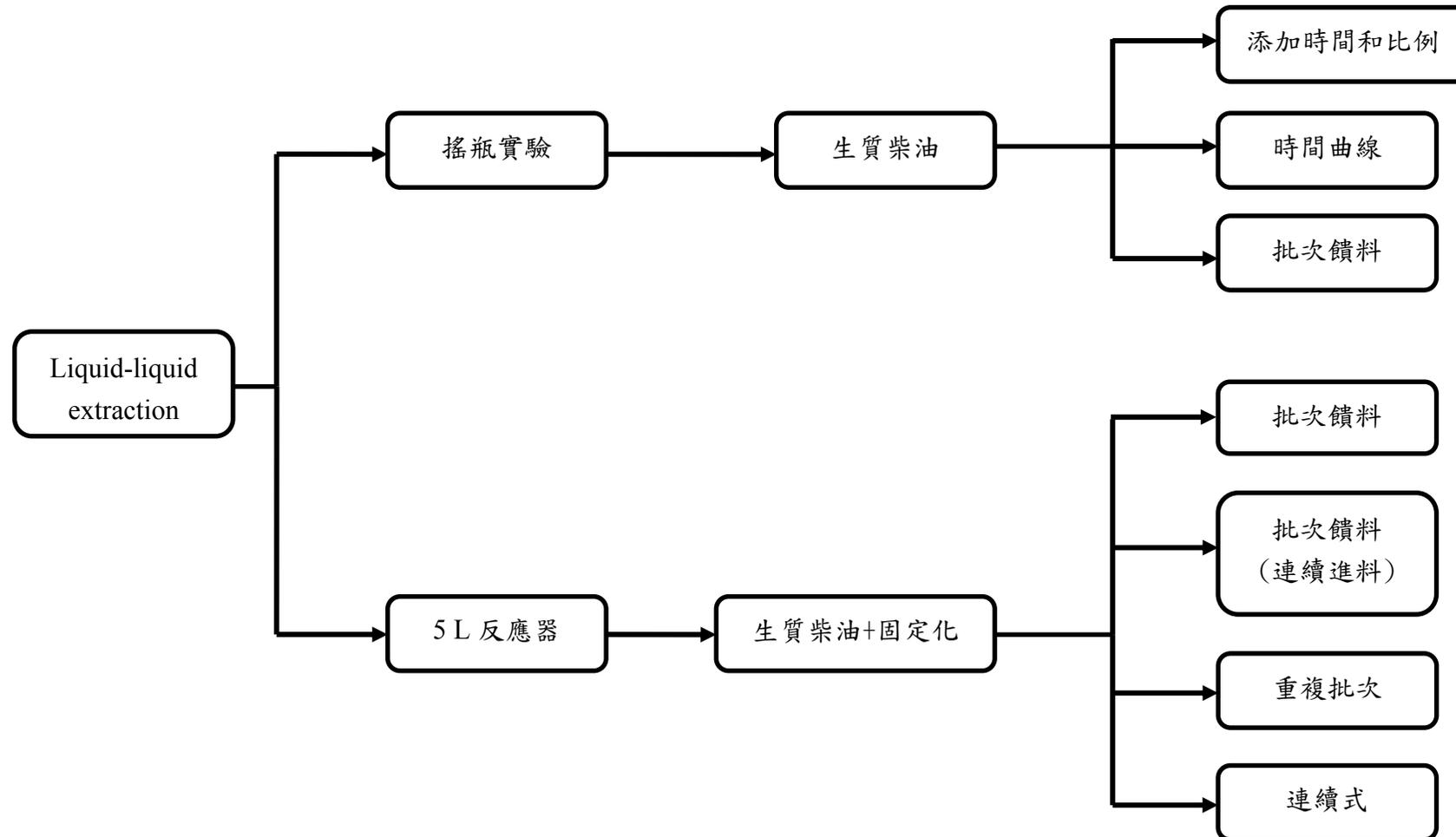


圖 3-2 實驗架構

### 3-5 實驗步驟

#### 3-5.1 生質柴油添加的時間點與比例之選擇

目的:探討在不同時間點添加不同比例的生質柴油對 *C. acetobutylicum* 生產丁醇之影響。

- (1) 配置 38g/L 的 SM 培養基 50 mL，培養 30 小時。
- (2) 以 10%接菌量將 SM 接至含有 25mL FM 的搖瓶中，共 24 瓶。
- (3) 添加 12.5mL 和 25mL 的生質柴油各三瓶，其 FM 對油的體積比例為 1:0.5 和 1:1，通入混合氣體(50% CO<sub>2</sub> 和 50% N<sub>2</sub>)形成厭氧環境，並在瓶口用封口膜封緊，於 37°C 培養箱中培養 72 小時。
- (4) 剩餘的 18 瓶搖瓶在通氣培養 12、24 和 36 小時的時候，從培養箱中隨機取六瓶來，重復第(3)實驗步驟，再放回 37°C 的培養箱培養到 72 小時。

#### 3-5.2 添加生質柴油之時間曲線變化

目的:探討添加生質柴油其時間對 *C. acetobutylicum* 生長之變化。

- (1) 配置 38g/L 的 SM 培養基 50 mL，培養 30 小時。
- (2) 以 10%接菌量將 SM 接至滅完菌含有 25 mL FM 的搖瓶中，共 18 瓶。
- (3) 將 18 瓶已接完菌的 FM 分別加入 25 mL 的生質柴油，其 FM 對油的體積比例為 1:1，之後通入混合氣體形成厭氧環境，於 37°C 培養箱中培養。
- (4) 每隔 12 小時取 3 瓶搖瓶出來作分析，觀察時間對菌體生長之變化。

### 3-5.3 搖瓶批次饋料發酵程序

目的:探討當原本碳源消耗完時，中途進行饋料，其菌體是否繼續生長。

- (1) 配置 38g/L 的 SM 培養基 50 mL，培養 30 小時。
- (2) 以 10%接菌量將 SM 接至滅完菌含有 25 mL FM 的搖瓶中，共 24 瓶。
- (3) 將 24 瓶已接完菌的 FM 分別加入 25 mL 的生質柴油，之後通入混合氣體形成厭氧環境，於 37°C 培養箱中培養，並每隔 12 小時從培養箱取 3 瓶出來進行分析。
- (4) 當培養到 48 小時的時候，將剩下的 12 瓶搖瓶取出，加入少量含高濃度葡萄糖的 FM 培養基 2 mL，將葡萄糖濃度調回到 20 g/L 左右，之後通入混合氣體再放回培養箱繼續培養，並每隔 12 小時取 3 瓶出來進行分析。

### 3-5.4 5L 反應器批次饋料發酵程序

目的:探討放大培養進行批次饋料對發酵丁醇生產之影響

- (1) 配置 38g/L 的 SM 培養基 100 mL，培養 30 小時。
- (2) 配置 1 L 的 FM 培養基，置入 5 L 的反應器中，並添加磚頭(粒徑 1.68-2.38 mm、充填量 200 g)，以及 2 L 的生質柴油。
- (3) 以 10%接菌量將 SM 接至上述的 5 L 反應器中，並持續通入混合氣體(50% CO<sub>2</sub> 和 50% N<sub>2</sub>)維持厭氧環境，置於 37°C 的恆溫水槽中進行培養。
- (4) 在 48、72 和 96 小時當發酵液中葡萄糖濃度消耗至 10 g/L 以下時，饋入少量

含高濃度葡萄糖濃縮液的 FM 培養基，將發酵液中葡萄糖濃度調回到 40 g/L

左右繼續培養，其培養時間為 144 小時。

### 3-5.5 5L 反應器批次饋料(連續進料)發酵程序

目的:探討放大培養進行批次饋料(連續進料)對發酵丁醇生產之影響

- (1) 配置 38g/L 的 SM 培養基 100 mL，培養 30 小時。
- (2) 配置 1 L 的 FM 培養基，置入 5 L 的反應器中，並添加磚頭(粒徑 1.68-2.38 mm、充填量 200 g)，以及 2 L 的生質柴油。
- (3) 以 10%接菌量將 SM 接至上述的 5 L 反應器中，並持續通入混合氣體(50% CO<sub>2</sub> 和 50% N<sub>2</sub>)維持厭氧環境，置於 37°C 的恆溫水槽中進行培養。
- (4) 當發酵液中葡萄糖濃度消耗至 10 g/L 以下時，把高濃度葡萄糖(400 g/L)濃縮液的 FM 培養基饋入，其饋料速度為 5 mL/hr，將葡萄糖濃度維持在 10 g/L 的左右，培養時間為 114 小時。

### 3-5.6 5L 反應器重複批次饋料(Repeated Fed-batch)發酵程序

目的:探討重複批次饋料對發酵生產丁醇之影響

- (1) 配置 38g/L 的 SM 培養基 100 mL，培養 30 小時。
- (2) 配置 1 L 的 FM 培養基，置入 5 L 的反應器中，並添加磚頭(粒徑 1.68-2.38 mm、充填量 200 g)，以及 2 L 的生質柴油。

- (3) 以 10%接菌量將 SM 接至上述的 5 L 反應器中，並持續通入混合氣體(50% CO<sub>2</sub> 和 50% N<sub>2</sub>)維持厭氧環境，置於 37°C 的恆溫水槽中進行培養。
- (4) 當葡萄糖消耗至 10 g/L 以下時，將發酵液取一半(500 mL)出來，再饋入 500 mL 新的培養基，將發酵液中葡萄糖濃度拉回到 70 g/L 左右繼續培養，培養時間為 132 小時。

### 3-5.7 5L 反應器連續式(Continuous)發酵程序

目的:探討發酵液跟生質柴油都連續式對發酵丁醇生產之影響

- (1) 配置 38g/L 的 SM 培養基 100 mL，培養 30 小時。
- (2) 配置 1 L 的 FM 培養基，置入 5 L 的反應器中，並添加磚頭(粒徑 1.68-2.38 mm、充填量 200 g)，以及 2 L 的生質柴油。
- (3) 以 10%接菌量將 SM 接至上述的 5 L 反應器中，並持續通入混合氣體(50% CO<sub>2</sub> 和 50% N<sub>2</sub>)維持厭氧環境，置於 37°C 的恆溫水槽中進行培養。
- (4) 當葡萄糖濃度消耗至 10 g/L 以下時，開始進行連續式饋料，饋料濃度為 85 g/L，饋料速度為 24 mL/hr。
- (5) 在培養到 60 個小時的時候，生質柴油也開始進行連續式替換，替換速率也是 24 mL/hr。

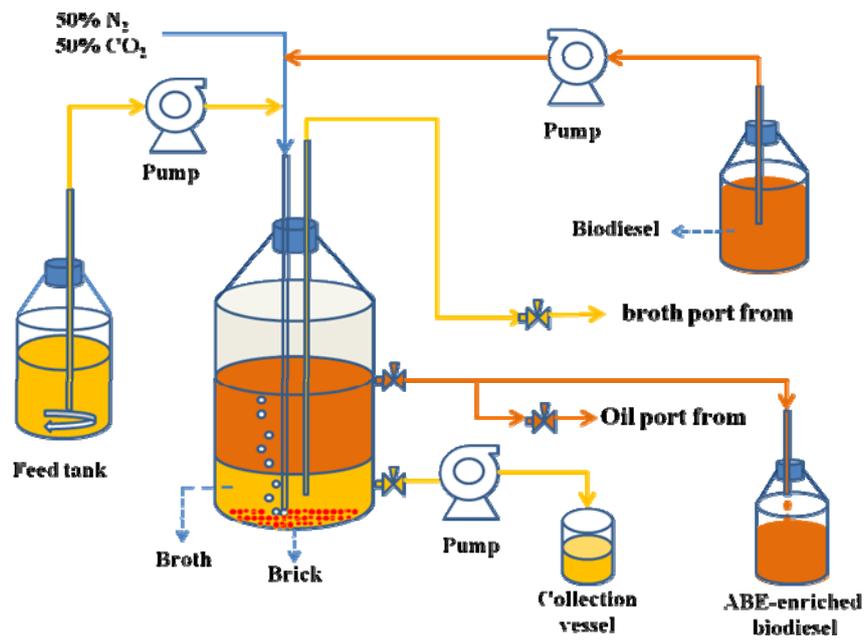


圖 3-3 連續式發酵設備簡圖



圖 3-4 連續式發酵設備圖

## 第四章 結果與討論

### 4-1 添加生質柴油於發酵液中之時間點與添加量之探討

本次實驗探討不同時間點添加不同體積比的生質柴油對 *C. acetobutylicum* 發酵生產丁醇之影響。實驗結果如圖 4-1 所示，控制組(control)是沒添加生質柴油單純培養 72 小時，從圖中可以看到有添加生質柴油的測試組其總丁醇濃度都比未添加的控制組 10.18 g/L 來得高，且葡萄糖都有消耗完，而就生質柴油添加的比例而言可以發現，不論在哪個時間點添加，1:1 的效果都比 1:0.5 來的好，其原因可以從表 4-1 中知道，因為添加 1:1 的生質柴油量比 1:0.5 來的多，相對的從發酵液中萃取得到的丁醇量也跟著提高，讓發酵液維持在一個更低丁醇濃度的狀態，更有利於菌體的生長與發酵，因此，可證實在 ABE 發酵的過程中添加生質柴油對於提高丁醇的產量是有效果的。其中，又以在 24 小時添加 1:1 的生質柴油對菌體生產丁醇有最佳的效果，其總丁醇濃度可來到  $15.51 \pm 1.95$  g/L。然而，在零點添加 1:1 比例的生質柴油，總丁醇濃度為  $14.76 \pm 1.13$  g/L，跟在 24 小時添加相比其效果差異並不大，因此，考慮到日後實驗操作過程中的方便性與染菌之風險，之後搖瓶實驗都選用在零點添加 1:1 的生質柴油來進行培養之研究。

有文獻指出，利用 *C. acetobutylicum* ATCC824 菌株進行培養，當培養到 48 小時的時候再將生質柴油加入對於 ABE 發酵會有最好的效果，在第二章文獻回顧的表 2-7 中可以發現，跟丁醇相比，生質柴油更優先萃取丁酸，所以在產酸期的這段期間先不要將生質柴油與發酵液混合，可避免生質柴油萃取過多的丁酸，

有助於菌體在產溶劑期間生產更多丁醇，也幫助生質柴油萃取更多的丁醇而非丁酸(Li et al., 2010)。然而，因為在下一個實驗探討中發現，沒有添加生質柴油單純培養的控制組，在培養到 36 小時的時候，其發酵液中丁醇濃度已經快達到高點，也就是丁醇會毒化細胞的 10 g/L 濃度，而且 biomass 也開始往下降，此時才進行添加生質柴油的動作對於菌體生產 ABE 的效果不大。因此，推測本實驗並不適合在 48 小時這個時間點才進行添加生質柴油。

圖 4-2 和 4-3 為本實驗室測量丁醇和丁酸在水相和油相中萃取速率的情形，從圖中可以發現在水相的丁醇濃度從原來的 11 g/L 開始穩定下降，其油相中的丁醇濃度也開始穩定上升，直到 180 分鐘之後丁醇濃度達到穩定，此時丁醇的分配系數為 0.8 左右。而水相中丁酸濃度雖然在一開始的前 60 分鐘下降速率很快，但之後就維持在一定值左右達到平衡，其分配系數約在 0.67 左右，與文獻所指的 1.62 有很大的一個差距，研判雖然丁酸的分配系數很高，但其動力學的平衡系數卻很低，需要很長一段時間才能達到如此高的分配系數，而在這段期間，發酵液中的丁酸也轉換成丁醇了。因此，可證實在零點添加生質柴油對於丁醇的生產並不會有太大的影響。

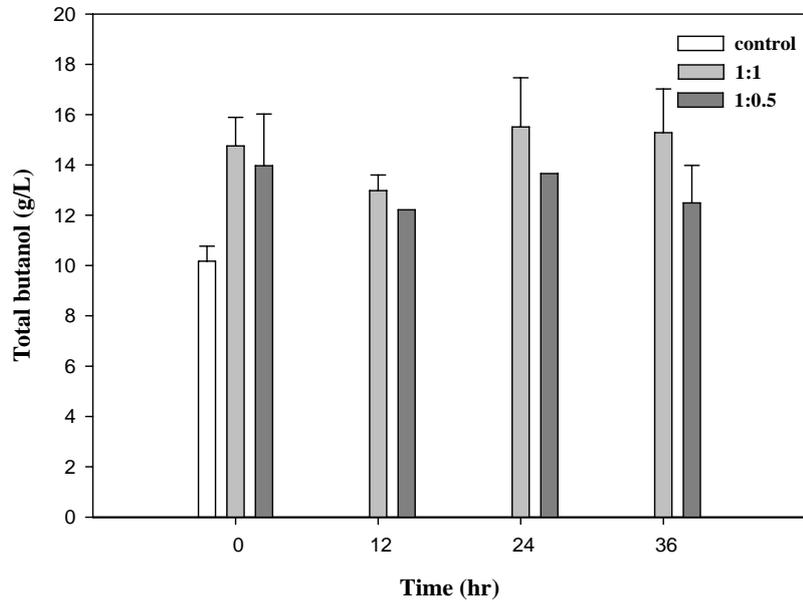


圖 4-1 不同時間點添加不同比例的生質柴油其總丁醇生產量之情形

表 4-1 不同時間點添加不同比例的生質柴油其水相和油相中丁醇濃度

添加時間 (hr)	生質柴油			
	1:1		1:0.5	
	水相丁醇(g/L)	油相丁醇(g/L)	水相丁醇(g/L)	油相丁醇(g/L)
0	6.95	7.81	8.88	10.19
12	4.89	8.09	6.98	10.47
24	6.06	9.46	8.06	11.18
36	6.35	8.93	7.06	10.85

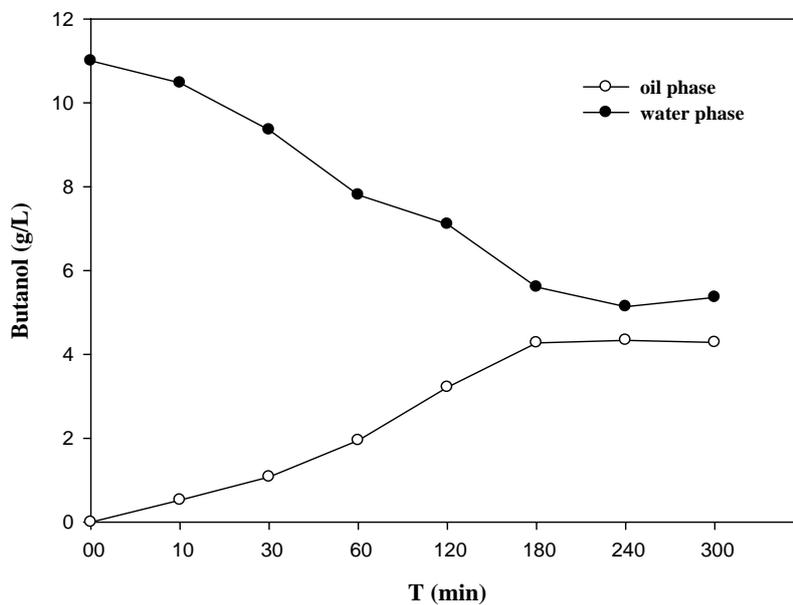


圖 4-2 丁醇在水相和油相中的萃取速率 (25 mL 的生質柴油與 25 mL 包含 0.25 g 丁醇的去離子水相混合，在 37°C 的培養環境中萃取 300 分鐘)

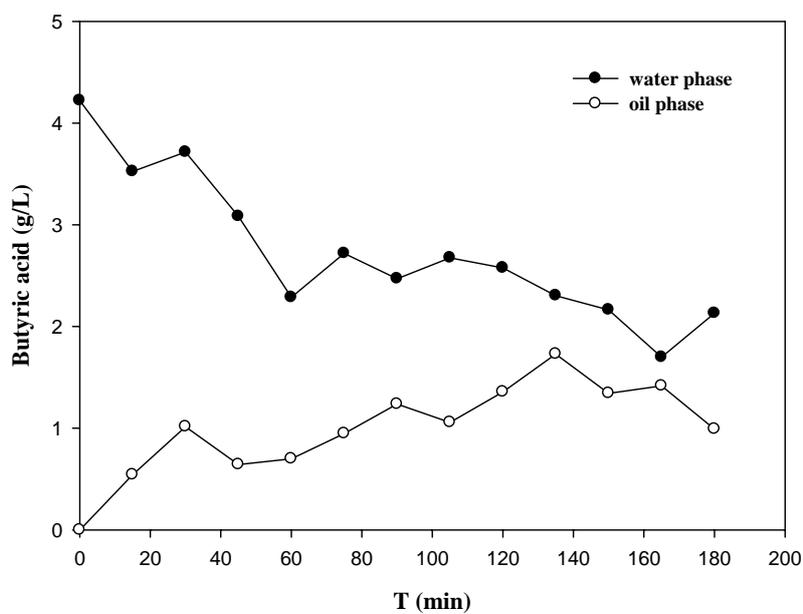


圖 4-3 丁酸在水相和油相中的萃取速率 (400 mL 的生質柴油與 400 mL 包含 2 g 丁酸的去離子水相混合，在 37°C 的培養環境中萃取 180 分鐘)

## 4-2 添加生質柴油之時間曲線變化

本次實驗探討添加生質柴油的測試組(1:1) vs.控制組(control)之時間曲線變化。實驗結果如圖 4-4 和 4-5 所示，在培養到 24 小時的時候，兩者都有最大的生物量 3.08 g/L 和 2.96 g/L，而此時 pH 也來到最低的 4.04 和 4.01，研判此時為產酸期(acidogenic phase)，大量的有機酸如乙酸跟丁酸等被生成，才導致 pH 值一直往下掉，之後，由於進入產溶劑期(solventogenic phase)，大量有機酸經過多道複雜的代謝路徑和酵素酶催化，轉變成 ABE 後，其 pH 才開始回升，而最後兩者的 pH 值都維持在 4.4 左右。

從圖 4-4 中可以發現，在培養到 36 小時的時候，其控制組的葡萄糖已經不太會繼續消耗，研判因為此時發酵液內丁醇濃度已達到會抑制細胞生長的濃度 10 g/L，才導致葡萄糖無法被完全利用完，與文獻所指的當丁醇濃度只要有 1% 就會抑制細胞生長相符(周, 2009)，其 ABE 生產速率(productivity)和轉化率(yield)分別是 0.41 g/L/hr 和 0.25 g/g。而測試組因為生質柴油不斷同步移除發酵液內的丁醇，使發酵液維持在一個低丁醇濃度狀態，有助於菌體的生長與碳源之利用，在 48 小時的時候，其葡萄糖已全部利用完，而在 72 小時有最大的丁醇濃度  $16.97 \pm 0.82$  g/L，其 ABE 生產速率與轉化率分別是 0.44 g/L/hr 和 0.34 g/g，跟控制組相比之下，其生產速率與轉化率都有提升，由此可說明利用液-液萃取技術將生質柴油應用在 ABE 發酵中，對於丁醇生產具有不錯的效果與可行性。



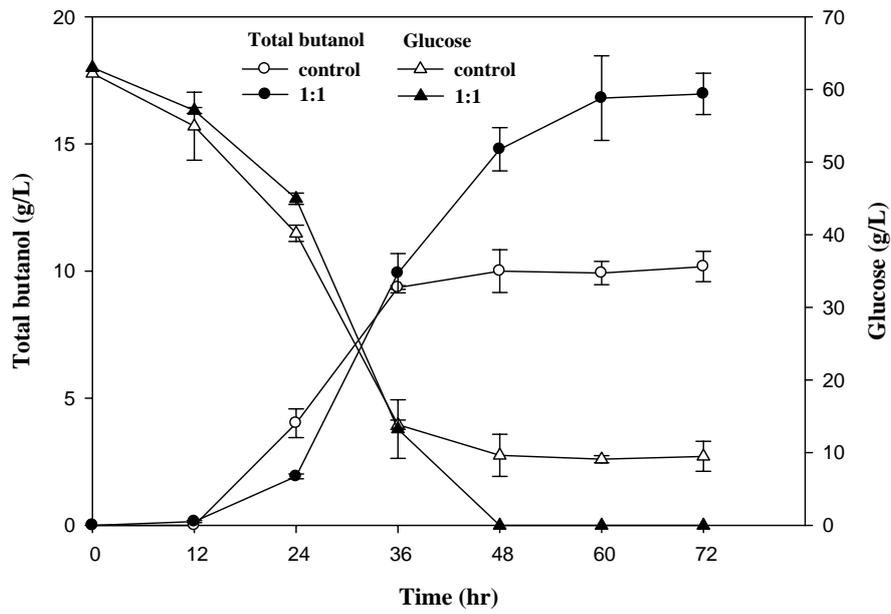


圖 4-4 添加生質柴油(1:1)與控制組之總丁醇濃度和葡萄糖消耗量之時間曲線

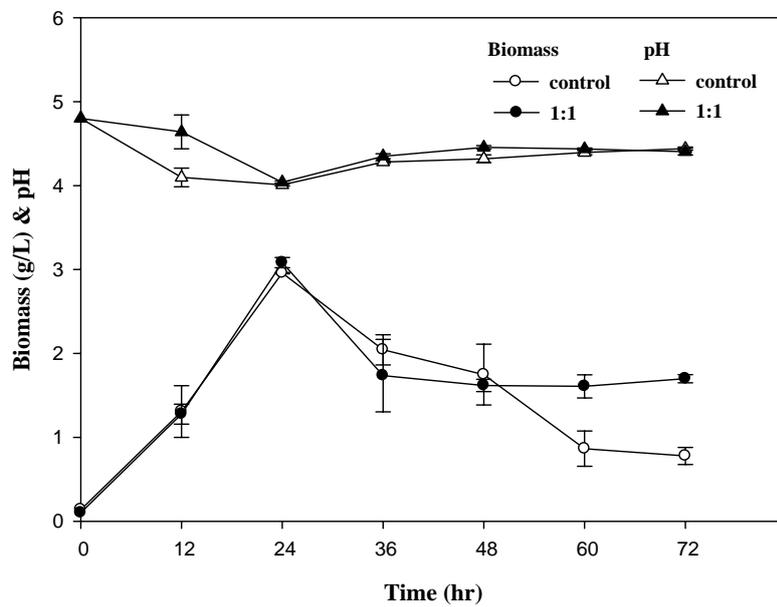


圖 4-5 添加生質柴油(1:1)與控制組之生物量和 pH 之時間曲線

### 4-3 搖瓶批次饋料實驗

本次的實驗探討在 48 小時當發酵液中的葡萄糖消耗完時，再添加新的碳源對於菌體生產丁醇之影響。實驗結果如圖 4-6 所示，在培養 48 小時的時候添加含高濃度的葡萄糖 2 mL，將發酵液中葡萄糖濃度從原本的 0 g/L 調回到 18 g/L 左右繼續培養，從圖中可以看到葡萄糖有繼續被菌體消耗，且在 84 小時的時候已被完全消耗完，其最高總丁醇濃度來到 29.51 g/L，ABE 的生產速率和轉化率 (ABE 生成濃度/葡萄糖消耗濃度) 分別是 0.44 g/L/hr 和 0.45 g/g，跟之前的批次實驗相比，其生產速率仍保有一定的水準維持不變，但轉化率則是從原本的 0.34 g/g 上升至 0.45 g/g，有明顯提升的趨勢，因此，可證實在發酵的過程中，當葡萄糖快被消耗完時再添加新的培養基將葡萄糖濃度提高，其菌體還是會生長及生產 ABE 溶劑，然而前提是發酵液和油相中的丁醇濃度還未達到抑制菌體生長之濃度。圖 4-7 為添加 1:1 生質柴油之批次饋料中水相和油相的丁醇濃度，圖中可看到在 84 小時的時候，其水相和油相都有最大的丁醇濃度，分別是 13.65 g/L 和 15.86 g/L，而在培養 60 小時之後，其丁醇在油相的分配系數大致維持在 1.1-1.2 之間，此系數也與文獻所說的 1.23 非常接近(Qing et al., 2010)。

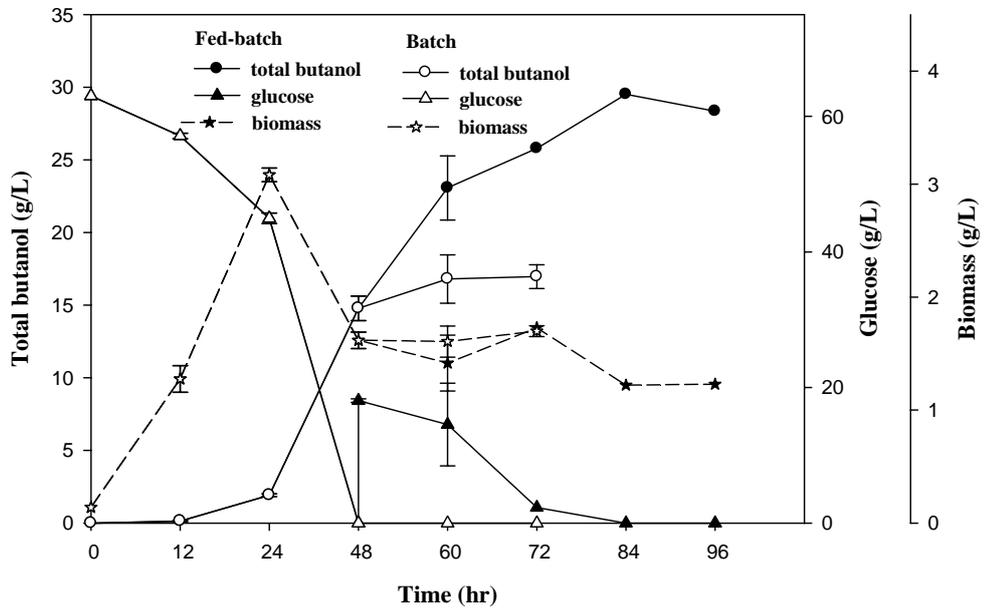


圖 4-6 添加 1:1 生質柴油其批次與批次饋料之比較

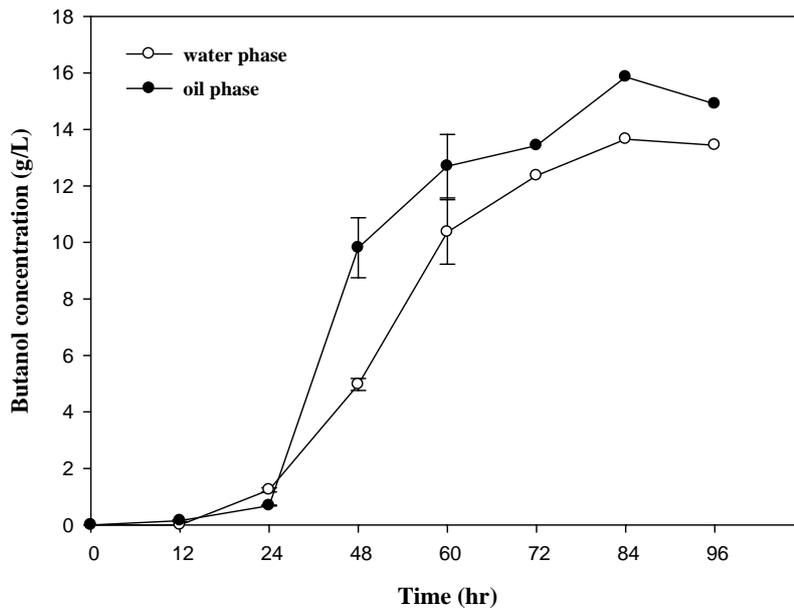


圖 4-7 添加 1:1 生質柴油之批次饋料中水相和油相的丁醇濃度

#### 4-4 5 L 反應器批次饋料實驗

本次實驗探討批次饋料對於放大培養 *C. acetobutylicum* 生產丁醇之影響，工作體積為 1 L，添加 2 L 的生質柴油和 200 g 固定化磚頭，其粒徑為 1.68-2.38 mm，起始葡萄糖濃度為 63 g/L，當葡萄糖濃度消耗至 10 g/L 以下時，開始進行批次饋料，饋入少量含高濃度葡萄糖(500 g/L)的培養基 60 mL，將發酵液中葡萄糖濃度調回到 40 g/L 左右繼續培養，由於饋入的培養基量與取樣量差不多，所以其總工作體積仍維持在 1 L 左右。實驗結果如圖 4-8 所示，在 48、72 和 96 小時的時候，因為發酵液中葡萄糖的濃度都低於 10 g/L，所以在這三個時間點進行批次饋料，將葡萄糖濃度拉調到 40 g/L 左右，其生產速率與轉化率分別是 0.38 g/L/hr 和 0.29 g/g，從圖中可以看到，在 120 小時的時候有最大總丁醇生產濃度 28.44 g/L，之後丁醇濃度便無法繼續提升，研判可能因為此時油相中丁醇的濃度已超過會抑制菌體生長的 10 g/L，間接影響發酵液中菌體的生長，使丁醇產量無法繼續提升。圖 4-9 為 ABE 在水相和丁醇在油相中的各別濃度。

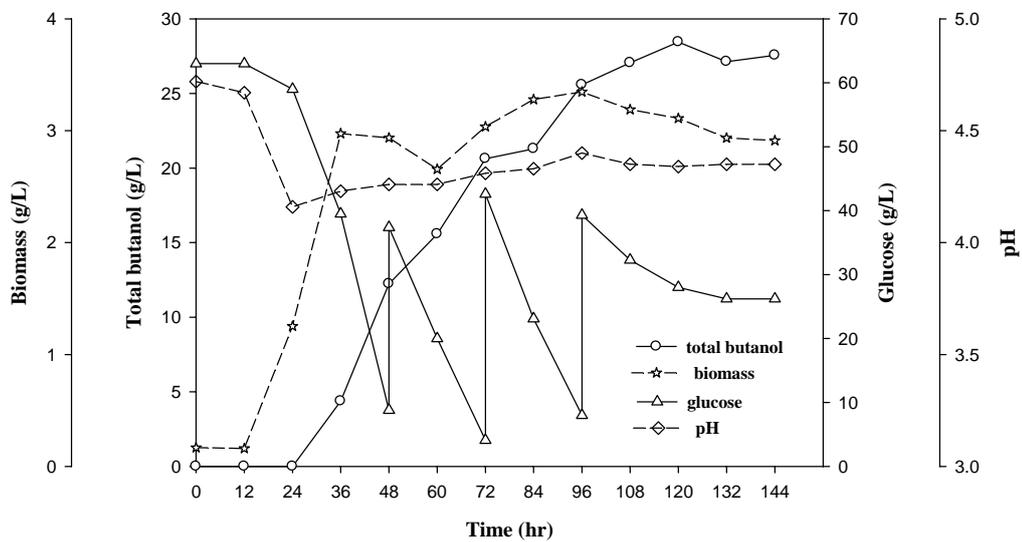


圖 4-8 5L 反應器批次饋料對 *C. acetobutylicum* 生長之影響

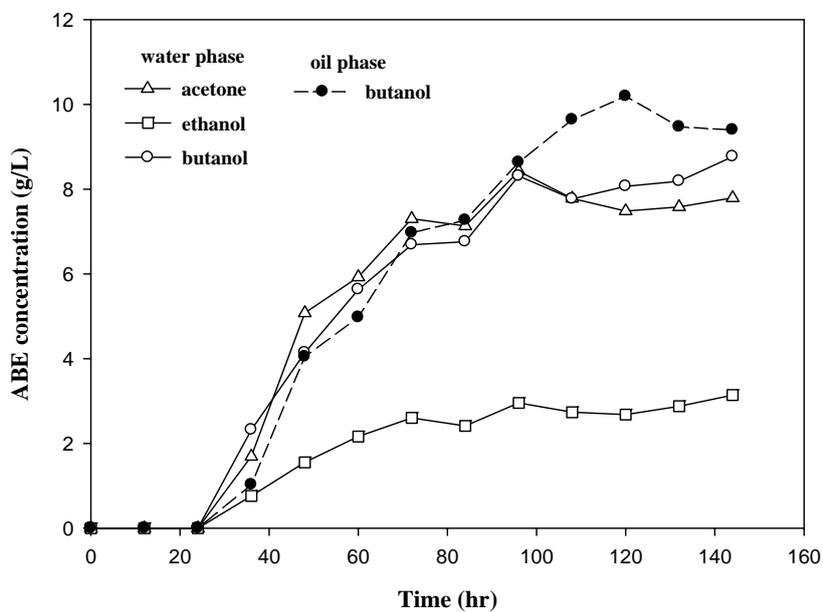


圖 4-9 5L 反應器批次饋料其 ABE 在水相和丁醇在油相中的各別濃度

#### 4-5 5 L 反應器批次饋料(連續進料)實驗

本次實驗探討批次饋料(連續進料)對於放大培養 *C. acetobutylicum* 生產丁醇之影響。工作體積為 1 L，添加 2 L 的生質柴油和 200 g 固定化磚頭，其粒徑為 1.68-2.38 mm，起始葡萄糖濃度為 61 g/L，當葡萄糖濃度消耗至 10 g/L 以下時，開始進行批次饋料(連續進料)，饋入少量含高濃度葡萄糖(400 g/L)的培養基，其流速為 4.5 mL/hr，將葡萄糖維持在 10 g/L 左右，由於饋入量與取樣量幾乎相等，所以總工作體積仍維持在 1 L。

實驗結果如圖 4-10 所示，在培養到 90 個小時之後，其總丁醇濃度並沒有明顯上升的趨勢，研判原因和前一個實驗相同，從圖 4-11 中可以看到，因為此實油相中丁醇的濃度已經超過會抑制菌體生長的 10 g/L，間接影響發酵液中菌體的生長，使丁醇產量無法繼續提升。在培養到 108 小時的時候，有最大的總丁醇生產濃度 29.76 g/L，其生產速率和轉化率分別是 0.43 g/L/hr 和 0.28 g/g，與前一個批次饋料實驗 0.38 g/L/hr 和 0.29 g/g 相比，其生產速率有提升的趨勢。

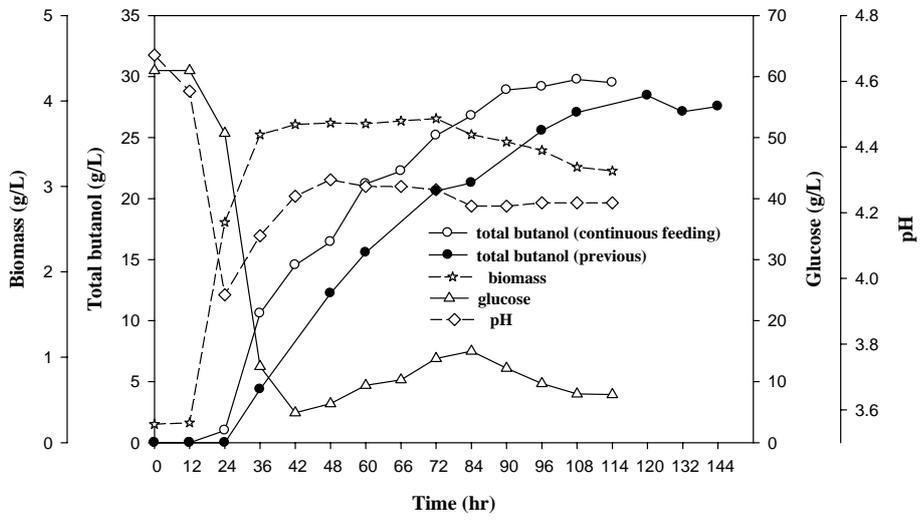


圖 4-10 5L 反應器批次饋料(連續進料)對 *C. acetobutylicum* 生長之影響

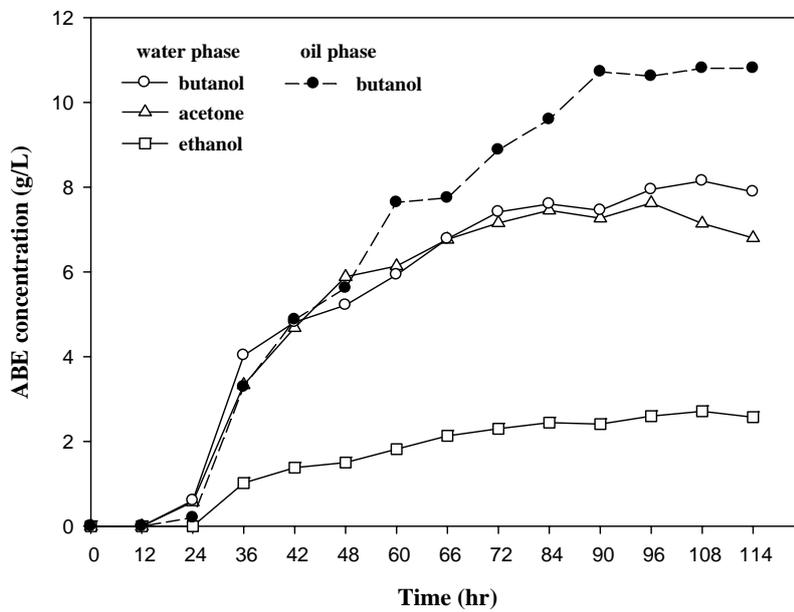


圖 4-11 5L 反應器批次饋料(連續進料)其 ABE 在水相和丁醇在油相中的各別濃

度

#### 4-6 5 L 反應器重複批次饋料(Repeated Fed-batch)實驗

本次實驗探討重複批次對於放大培養 *C. acetobutylicum* 生產丁醇之影響。工作體積為 1 L，添加 2 L 的生質柴油和 200 g 固定化磚頭，其粒徑為 1.68-2.38 mm，起始葡萄糖濃度為 60 g/L，當葡萄糖濃度消耗至 10 g/L 以下時，開始進行重複批次實驗，先將反應器內的發酵液取 500 mL 出來，再饋入等體積新的培養基，將發酵液內葡萄糖濃度提高繼續培養，其發酵液總體積仍維持在 1 L。

實驗結果如圖 4-12 所示，在培養到 36 和 66 小時的時候，此時葡萄糖濃度已低於 10 g/L，所以進行重複批次饋料饋料，將發酵液內葡萄糖濃度調回到 70 g/L 繼續培養，在重複批次的過程中，pH 都會上升之後再往下掉的情形，推測因為菌體在接受到新碳源後又開始進入產酸期，生產有機酸，導致 pH 下降，之後進入產溶劑期，將有機酸轉變成 ABE，其 pH 才又回升。而對菌體量而言，在饋料的過程中，雖然菌體濃度都降到 2.7 g/L 左右，但在第一次饋料過後，其菌體量很快的突破 3.3 g/L，在 66 小時時來到本次實驗次高的 3.59 g/L，而第二次饋料時其菌體量只有回升到 3 g/L 左右，持平一段時間後便開始往下掉，推測因為在第二次饋料時，此時油相中的丁醇濃度已來到 8.5 g/L，多少會對發酵液內的菌體產生一些抑制，降低菌體的生長速率，在培養到 96 小時的時候，此時油相中的丁醇濃度達到高點，菌體開始死亡、停止代謝。在 120 小時的時候有最大的總丁醇生產濃度 36.28 g/L，其生產速率與轉化率分別是 0.51 g/L/hr 和 0.33 g/g。

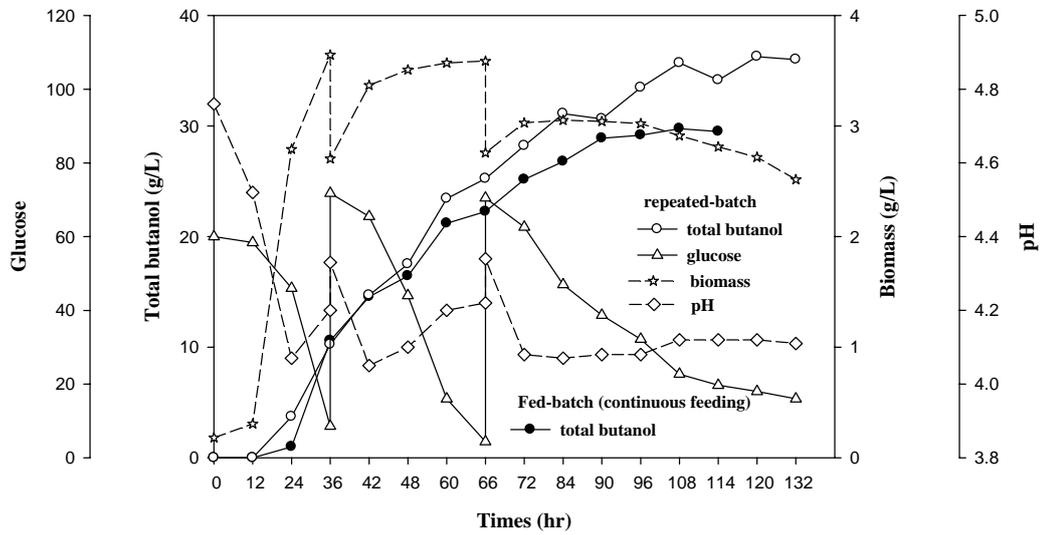


圖 4-12 5L 反應器重複批次饋料對 *C. acetobutylicum* 生長之影響

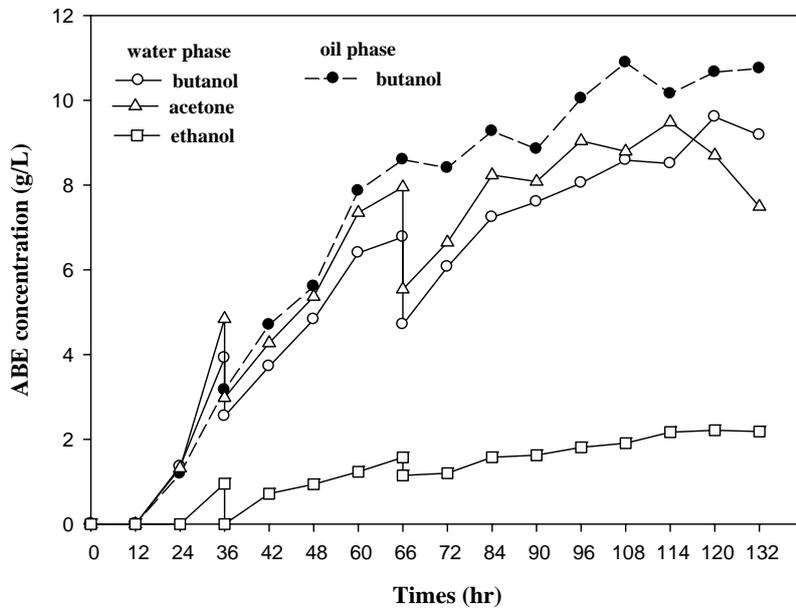


圖 4-13 5L 反應器重複批次饋料其 ABE 在水相和丁醇在油相中的各別濃度

#### 4-7 5 L 反應器連續式(Continuous)發酵實驗

本次實驗探討連續式發酵對於放大培養 *C. acetobutylicum* 生產丁醇之影響。工作體積為 1 L，添加 2 L 的生質柴油和 200 g 固定化磚頭，其粒徑為 1.68-2.38 mm，起始葡萄糖濃度為 60 g/L，當葡萄糖濃度消耗至 10 g/L 以下時，開始進行連續式饋料，將葡萄糖濃度維持在 10 g/L 左右，先前幾個實驗結果發現，當培養到後期時，其發酵液中丙酮濃度有偏高的趨勢，因此本次實驗饋料速度為 24 mL/hr，將丙酮濃度維持在 5 g/L 左右，饋料濃度為 80 g/L，而在培養到 60 小時的時候，油相也開始進行連續續替換，替換速率為 24 mL/hr。

實驗結果如圖 4-14 所示，圖中可以發現葡萄糖濃度並沒有如預期的那樣維持在 10 g/L 左右，而是呈現波浪的形式在 0-15 g/L 之間來回震盪，且跟菌體量與丁醇生產濃度呈現對比的關係，推測是因為當油相中的丁醇濃度過高時，便會開始抑制發酵液中菌體的生長，使菌體開始死亡，停止代謝，葡萄糖開始累積，由於發酵液與生質柴油仍然持續在進行饋料與替換，使兩相中的丁醇濃度下降，當降到某一程度時，此時菌體受丁醇抑制的情況大幅降低，因此菌體又開始生長、消耗葡萄糖、代謝轉成 ABE，一直重複這過程，才導致葡萄糖濃度對菌體量與丁醇濃度呈現對比的波浪形式發生。之後在培養到 450 個小時左右達到穩定，其水相和油相中平均的丁醇濃度為 7.36 g/L 和 8.47 g/L，而 ABE 的生產速率與轉化率分別是 0.55 g/L/hr 和 0.27 g/g，與本實驗室之前的固定化連續式培養相比分別

是 0.29 g/g 和 0.46 g/L/hr，其生產速率有明顯提升之趨勢。因此，從以上的結果

可以看出，利用生質柴油來移除丁醇，提升丁醇的生產速率是可行的。

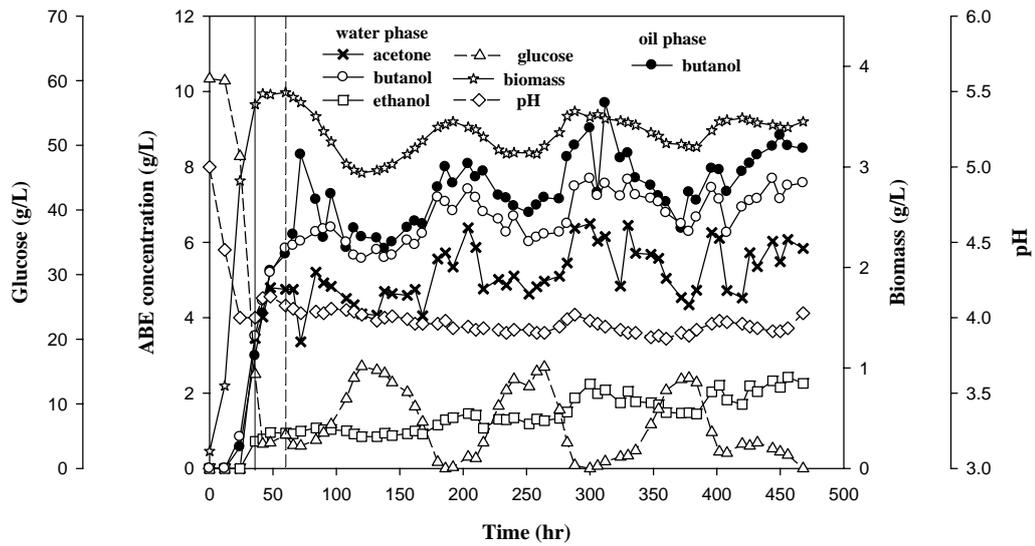


圖 4-14 5L 反應器連續式發酵對 *C. acetobutylicum* 生長之影響(饋料葡萄糖濃度為 80 g/L，饋料速度為 24 mL/hr，連續式時間為 432 小時，生質柴油的替換速率為 24 mL/hr，替換時間為 408 小時。)



表 4-2 不同發酵方法結合不同移除技術之 ABE 的 productivity 和 yield 比較表

Organism	Type of fermentation	Method for in Situ Product Removal	extractant	Solvent Conc. (g/L)	Productivity (g/L/hr)	Yield (g/g)	Reference
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>	Batch	Liquid-Liquid Extraction	CPOE	29.8	0.55	0.40	Ishizaki et al., (1999)
<i>C. beijerinckii</i>	Batch	Pervaporation	—	51.5	0.69	0.42	Qureshi and Blaschek (1999)
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>	Batch	Liquid-Liquid Extraction	Oleyl alcohol	27.9	0.52	0.38	Ishizaki et al., (1999)
<i>C. acetobutylicum</i> BCRC10639	Batch	Liquid-Liquid Extraction	Biodiesel	24.32	0.44	0.34	This study
<i>C. beijerinckii</i> BA101	Fed-batch	Gas stripping	—	233	1.16	0.47	Ezeji et al., (2004b)
<i>C. beijerinckii</i> BA101	Fed-batch	Pervaporation	—	165.1	0.98	0.43	Groot et al., (1984)
<i>C. acetobutylicum</i> BCRC10639	Fed-batch	Liquid-Liquid Extraction	Biodiesel	38.6	0.38	0.29	This study
<i>C. acetobutylicum</i> BCRC10639	Feb-batch*	Liquid-Liquid Extraction	Biodiesel	39.62	0.43	0.28	This study
<i>C. acetobutylicum</i> BCRC10639	Repeated Fed-batch	Liquid-Liquid Extraction	Biodiesel	55.33	0.51	0.33	This study

Organism	Type of fermentation	Method for in Situ Product Removal	extractant	Dilution rate (1/hr)	Productivity (g/L/hr)	Yield (g/g)	Reference
<i>C. acetobutylicum</i> B5313	Continuous	Liquid-Liquid Extraction	Oleyl alcohol and decanol	0.2	2.5	0.35	Bankar et al., (2012)
<i>C. acetobutylicum</i> P262	Continuous	Liquid-Liquid Extraction	Dibutyl phthalate	0.41	1.5	0.23	Qureshi et al., (1995)
<i>C. acetobutylicum</i> P262	Continuous	Liquid-Liquid Extraction	Oleyl alcohol	0.35	1.9	0.36	Qureshi et al., (1995)
<i>C. acetobutylicum</i> BCRC10639	Continuous	Liquid-Liquid Extraction	Biodiesel	0.024(broth) 0.012(biodiesel)	0.55	0.27	This study

\* continuous feeding

## 第五章 結論與未來展望

### 5-1 結論

- 一. 對於生質柴油添加量探討，發現添加 1~2 倍的生質柴油為最適合的添加量，過多的話會造成菌體在發酵初期有機酸被移除太多，使 pH 無法往下降，導致菌體生長延緩甚至受到抑制。而添加的時間點則是選擇在零點進行添加。
- 二. 在時間曲線比較方面，可發現添加生質柴油的測試組其生產速率和轉化率分別是 0.44 g/L/hr 和 0.34 g/g，跟控制組的 0.41 g/L/hr 和 0.25 g/g 相比都來的高。
- 三. 在搖瓶批饋料實驗中，證實當葡萄糖消耗完時再添加額外碳源，其菌體還是會繼續消耗利用，但前提是油相中丁醇濃度還沒達到高點去抑制細胞。
- 四. 在放大培養批次饋料的實驗中，其 ABE 的生產速率與轉化率分別是 0.38 g/L/hr 和 0.29 g/g。
- 五. 在放大培養批次饋料(連續進料)中，其 ABE 的生產速率與轉化率分別是 0.43 g/L/hr 和 0.28 g/g，跟上一個批次饋料相比，其生產速率有明顯上升之趨勢。
- 六. 在重複稀釋饋料實驗中，其 ABE 的生產速率與轉化率分別是 0.51 g/L/hr 和 0.33 g/g。
- 七. 在連續式方面，當稀釋速率為 0.024 1/hr，生質柴油之替換速率為 0.012 1/hr 時，其 ABE 生產速率與轉化率分別是 0.55 g/L/hr 和 0.27 g/g，顯示未來對 *C. acetobutylicum* 添加生質柴油做長時間連續式發酵是具有相當不錯的潛力與

可行性。

## 5-2 未來展望

目前本實驗是利用葡萄糖當碳源，其基質成本過高，並不適合利用於工業上的應用，未來希望可以利用替代性原料，例如使用玉米、番薯澱粉等或者是農業廢棄物(waste)、木質纖維(lignocelluloses)和甘油等來代替碳源，避免發酵程序產生與民爭食的隱憂。在菌種方面，可以利用基因改殖或者突變方式進行菌種改良，找出具備高溶劑產量、高生產速率與丁醇毒化耐受性高之菌種，以提升商業化潛力。雖然目前已有很多種萃取劑被拿來應用在 ABE 發酵上，但最後還是要進一步純化將丁醇從萃取劑中取出，其過程中通常都會造成很大的能源開銷，導致生產成本提高，因此本研究利用生質柴油來同步萃取移除丁醇做長時間連續式發酵

，不但能有效提升 ABE 的生產速率，而萃取完後的生質柴油即是產品，其燃料性質也因為含有 ABE 而有所提升，相對於其他技術而言更容易商業化量產，是相當具有潛力的丁醇生產方式。

## 參考文獻

- Amrita R., and Moholkar V. S. (2011). Biobutanol: science, engineering, and economic. *International Journal of Energy Research*, 36:277-323.
- Al-Zuhar S. (2007). Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1:57-66.
- Bahl H., Andersch W., and Gottschalk G. (1982). Continuous Production of Acetone and Butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a Two-Stage Phosphate Limited Chemostat. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 15:201-205.
- Bochman M., Cotton F. A., Murillo C. A., Wilkinson G. (1999). Advanced inorganic chemistry. USA: John Wiley and Sons, Inc.
- Blaschek H., Ezeji T. (1995). Production of acetone–butanol–ethanol (ABE) using DDGS: Pentose sugar utilization and impact of degradation products.
- Barton W. E., Daugulis A. J. (1992). Evaluation of solvents for extractive fermentation with *Clostridium acetobutylicum* and the use of poly(propylene glycol) 1200. *Applied Microbiology Biotechnology*, 36:632-639.
- Basu H. N., Norris M. E. (1996). Process for production of esters for use as a diesel fuel substitute using a non-alkaline catalyst. US patent 552516.

- Bankar S. B., Survase S. A., Singhal R. S., Granström T. (2012). Continuous two stage acetone–butanol–ethanol fermentation with integrated solvent removal using *Clostridium acetobutylicum* B 5313. *Bioresource Technology*, 106:110-116.
- Chen C. K., Blaschek H. P. (1999). Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium beijerinckii* BA 101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52:170-173.
- Dürre P. (1998). New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49:639-648.
- Durre P. (2007). Biobutanol : An attractive biofuel. *Biotechnol Journal*, 2:1525-1534.
- Evans P. J., Wang H. Y. (1988). Enhancement of butanol formation by *Clostridium acetobutylicum* in the presence of decanol-oleyl alcohol mixed extractants. *Applied and Environmental Microbiology*, 54:1662-1667.
- Ezeji T. C., Qureshi N., Blaschek H. P. (2003b). Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in-situ recovery by gas stripping. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19:595-603.
- Ezeji T. C., Qureshi N., Blaschek H. P. (2004a). Butanol fermentation Research:

- Upstream and Downstream Manipulations. *The Chemical Record*, 4:305-314.
- Ezeji T. C., Qureshi N., Blaschek H. P. (2004b). Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63:653-658.
- Falbe J. (1970). Carbon monoxide in organic synthesis. *Berlin-Heidelberg-New York:Springer Verlag*.
- Groot W. J., van der Lans R. G. J. M., Luyben K. C. A. M. (1992). Technologies for butanol recovery integrated with fermentations. *Process Biochemistry*, 27:61-75.
- Groot W. J., Soedjak H. S., Donck P. B., van der Lans R. G. J. M., Luyben K. Ch. A. M., Delft., Timmer J. M. K. (1990). Butanol recovery from fermentations by liquid-liquid extraction and membrane extraction. *Bioprocess Engineering*, 5:203-216.
- Grobben N. G., Eggink G. F., Cuperus F. P., Huizing H. J. (1993). Production of acetone, butanol and ethanol (ABE) from potato wastes: fermentation with integrated membrane extraction. *Applied Microbiology Biotechnology*, 39:494-498.
- Groot W. J., van den Qever., Kossen N. W. (1984). Pervaporation for simultaneous product recovery in the butanol/siopropanol batch fermentation. *Biotechnology*

*Letters*, 6:709-714.

Helwani Z., Othman M. R., Aziz N., Fernando W. J. N., Kim J. (2009). Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. *Fuel Processing Technology*, 90:1502-1514.

Ishizaki A., Michiwaki S., Crabbe E., Kobayashi G., Sonomoto K., Yoshino S. (1999). Extractive acetone- butanol-ethanol fermentation using methylated crude palm oil as extractant in batch culture of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87:352-356.

Jin C., Yao M., Liu H., Lee C. F., Ji J. (2011). Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15:4080-4106.

Jones D. T. and Woods D. R. (1986). Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews*, 50:484-524.

Kumar M., Gayen K. (2011). Development in biobutanol production: New insights. *Applied Energy*, 88:1999-2012.

Li Q., Cai H., Hao B., Zhang C., Yu Z., Zhou S., Chenjuan L. (2010). Enhancing Clostridial Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Production and Improving Fuel Properties of ABE-enriched Biodiesel by Extractive Fermentation with Biodiesel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162:2381-2386.

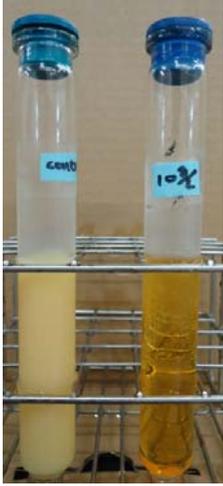
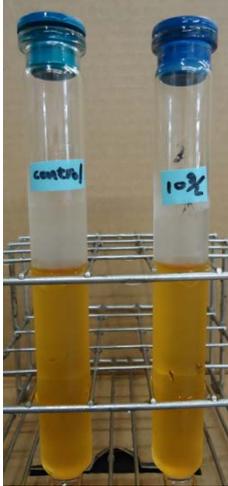
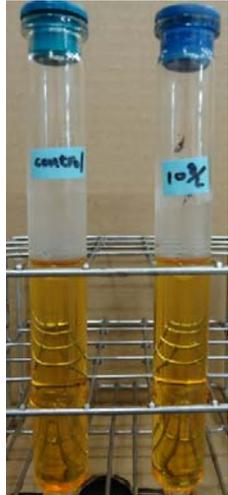
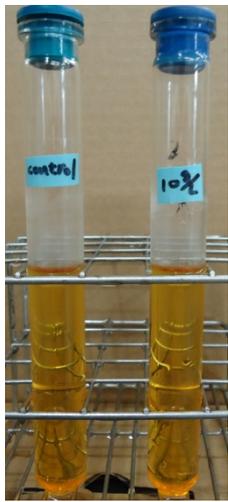
- Meher L. C., Vidya Sagar D., Naik S. N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10:248-268.
- Mahalaxmi S., Williford C. (2012). Biochemical conversion of biomass to fuels. *Handbook of Climate Change Mitigation*, 965-999.
- Ni Y., Sun Z. (2009). Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83:415-423.
- Qureshi N. and Maddox I. S. (1995). Continuous Production of Acetone-Butanol-Ethanol Using Immobilized Cell of *Clostridium acetobutylicum* and Integration with Product Removal by Liquid-Liquid Extraction. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80:185-189.
- Qureshi N., Maddox I. S. (1995). Continuous production of acetone-butanol-eyhanol using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* and integration with product removal by liquid-liquid extraction. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80:185-189.
- Qureshi N., Lai L. L., and Blaschek H. P. (2004). Scale-up of a high productivity continuous biofilm reactor to produce butanol by adsorbed cells of *Clostridium beijerinckii*. *Institution of Chemical Engineers*, 82:164-173.

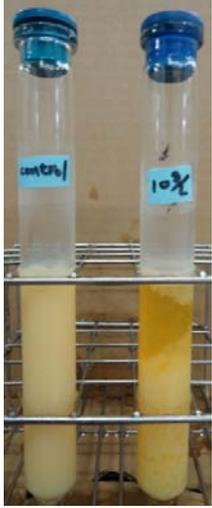
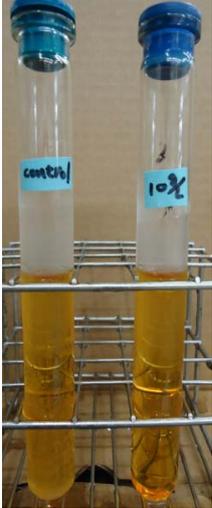
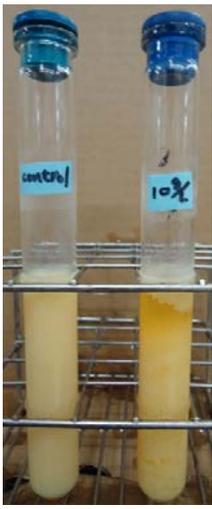
- Qureshi N., Hughes S., Maddox I. S., Cotta M. A. (2005). Energy-efficient recovery of butanol from model solutions and fermentation broth by adsorption. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 27:215-222.
- Qureshi N., and Blaschek H. (1999). Production of Acetone Butanol Ethanol (ABE) by a Hyper-Producing Mutant Strain of *Clostridium beijerinckii* BA101 and Recovery by Pervaporation. *Biotechnology Progress*, 15:594-602.
- Ramos M. J., Fernández C. M., Casas A., Rodríguez L., Pérez Á. (2009). Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, 261-268.
- Swodenk W. (1983). Ethanol als Rohstoff für die chemische Industrie. *Chemie Ingenieur Technik*, 55:683-688.
- Shaheen R, Shirley M, Jones DT. (2000). Comparative fermentation studies of industrial strains belonging to four species of solvent producing Clostridia. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2:115-124.
- Schuchardt U., Sercheli R., and Vargas R. M. (1998). Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9:199-210.
- 周世凱、許梅娟. (2009). 新能源—生物產丁醇. *科學發展*, 433:26-31.
- 吳建一、鐘宛真、葉修鋒. (2007). 固定化酵素之演進與展望. *化工*, 53:175-198.
- 李瑞真. (2011). 固定化 *Clostridium acetobutylicum* 進行連續式發酵生產丁醇之研

究. 東海大學化學工程與材料工程研究所.

## 附錄

附錄 1: 生質柴油與添加 10 g/L 丁醇的生質柴油在 3°C 和 6°C 的環境中之雲化情形

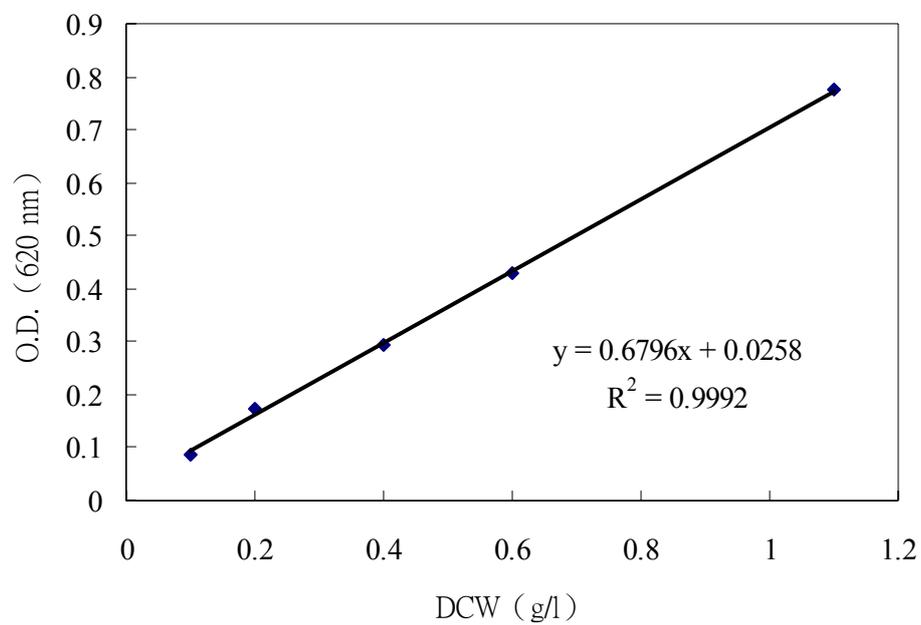
T(°C) T(min)	3°C	6°C
10 mins		
20 mins		
30 mins		

	3°C	6°C
40 mins		
50 mins		
60 mins		

上表是生質柴油(BD)和生質柴油+10g/L 的丁醇(BD10)在 3°C 和 6°C 的雲化情形。表中貼 control 標籤的是單純只有生質柴油沒添加丁醇，當溫度在 6°C 時，其 BD 在 40 mins 時開始有雲化的現象發生，且隨著時間的增長其雲化的情形(乳白色)也越來越明顯，而有添加 10g/L 丁醇的生質柴油也就是 BD10，直到 60 mins 時也還沒有明顯的雲化情形出現。

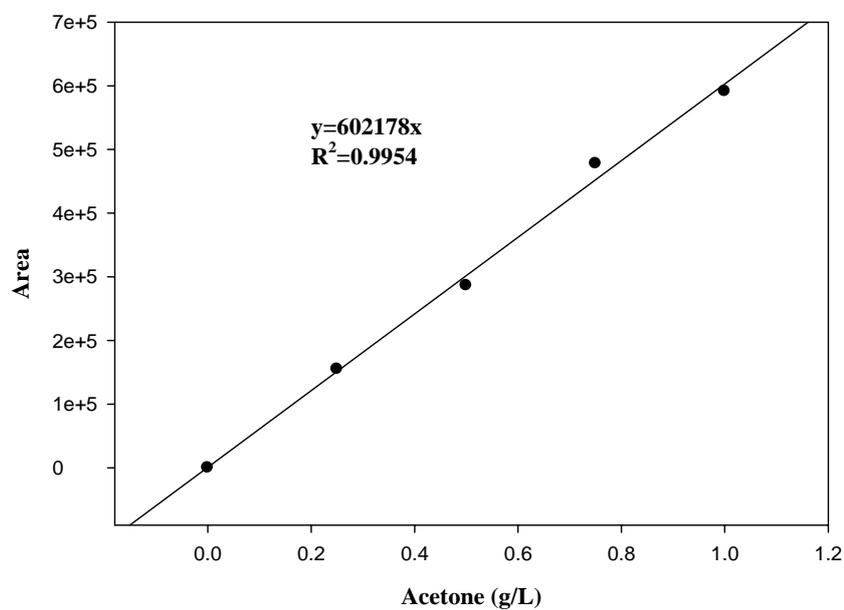
當我們把溫度降到 3°C 進行測試，可以發現其 BD 在 10 mins 時就幾乎已經完全雲化，而 BD10 也開始有雲化的現象發生，隨著時間的拉長，雖然雲化的部分也越來越多，但它並不是馬上而是慢慢形成，因此可以證實添加丁醇是可以增加 BD 的抗凍效果，使被雲化的時間拉長。

## 附錄 2: 菌體乾重(biomass)檢量線

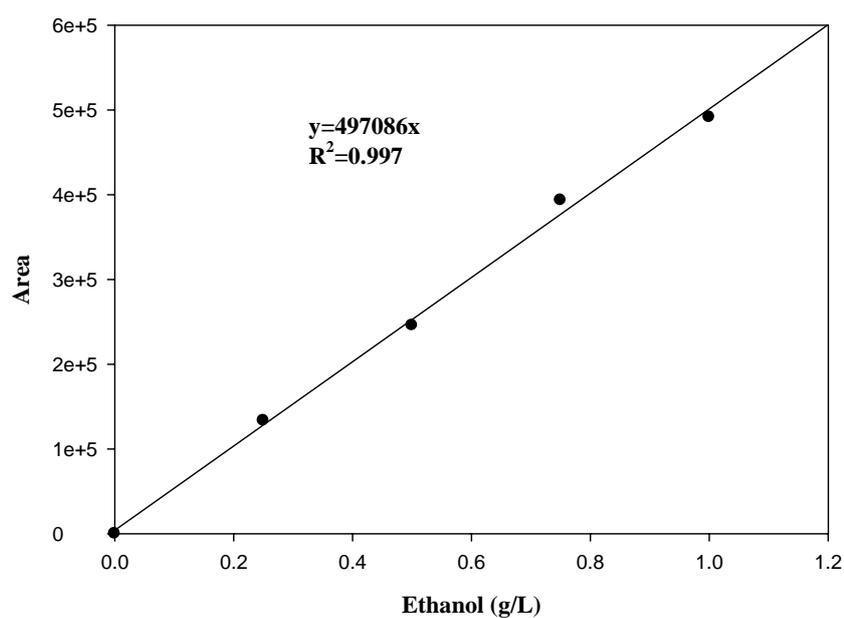


菌體乾重檢量線方程式:  $DCW(g/L) = (O.D. - 0.0258) / 0.6796$

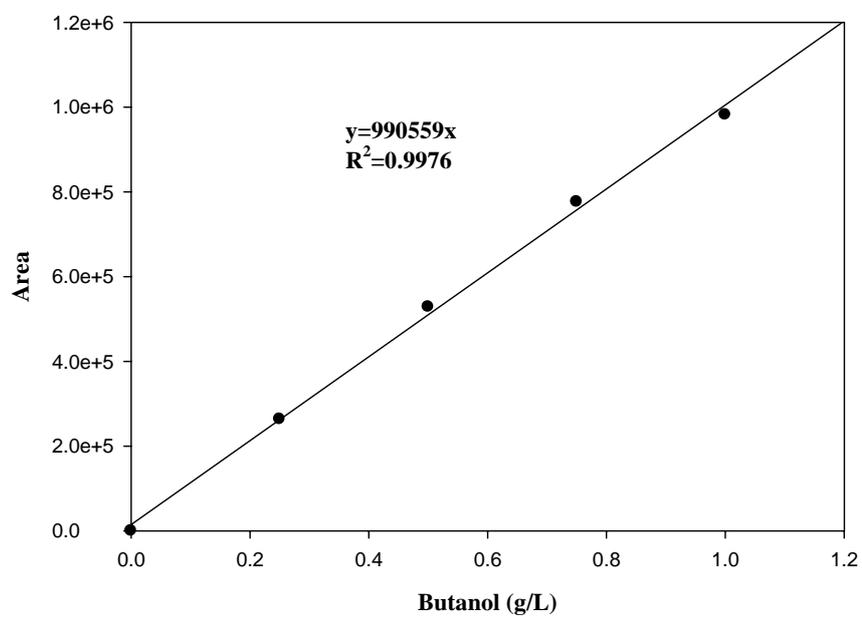
### 附錄 3: 丙酮(acetone)檢量線



### 附錄 4: 乙醇(ethanol)檢量線



附錄 5: 丁醇(butanol)檢量線



附錄 6: 油相丁醇(butanol)檢量線

