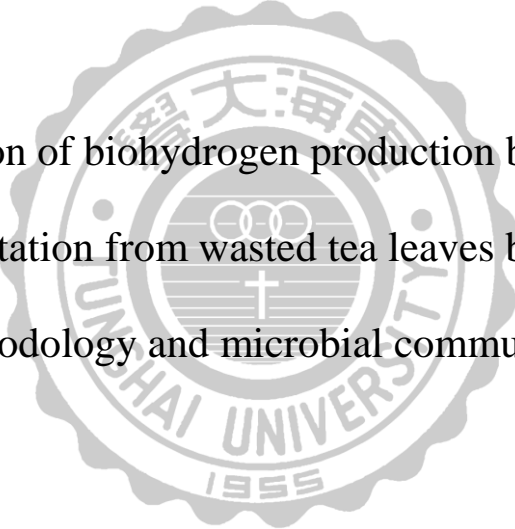


東海大學環境科學與工程研究所

碩士論文

以反應曲面實驗設計探討廢茶葉嗜熱產氫醱酵最適化條件及微生物菌群分析



Optimization of biohydrogen production by thermophilic hydrogen fermentation from wasted tea leaves by using response surface methodology and microbial community analysis

指導老師：黃啓裕 博士

研究生：劉宥鈞

中華民國一零四年七月

July 2015

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劉宥鈞君所提之論文

題目：以反應曲面實驗設計探討廢茶葉嗜熱產氫醱酵最適化條件及微生物菌群分析

Optimization of biohydrogen production by thermophilic hydrogen fermentation from wasted tea leaves by using response surface methodology and microbial community analysis

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 黃啟祐 (簽章)

104年7月13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劉宥鈞君所提之論文

題目：以反應曲面實驗設計探討廢茶葉嗜熱產氫醱酵最適化條件  
及微生物菌群分析

Optimization of biohydrogen production by thermophilic  
hydrogen fermentation from wasted tea leaves by using  
response surface methodology and microbial community  
analysis

---

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  (簽章)

委員 



---

中華民國 104 年 7 月 17 日

## 致謝

三年的時光轉眼間就過了，一路走來經歷過許多風風雨雨，如今終於破除一切萬難可以踏出去了。在這一刻心中是五味雜陳，總之容許我大喊一聲：終於畢業了！

在求學的過程中遇到很多難關阻礙，謝謝實驗室的諸位學長學弟妹們對我的包容體諒，不厭其煩的指教以及幫忙，沒有各位的協助我絕對無法順利完成學業。首先很感謝指導教授黃啟裕博士，在這三年中傳授給我的不僅只有學業上的知識，在為人處事的態度上更是受益良多。接著很感謝實驗的學長小胖、昱智、百淳，在我懵懵懂懂的時候給了很多建議跟指教。還有同梯以及都先走一步的佳崑、祿翔、良誌、慶錡，謝謝四位一直以來的扶持與幫助，課業以及實驗都幫了大忙。再來是學弟們昆翰、浩銘、至榮、皓瑋、叡致、明瀚，革命尚未成功仍須努力，實驗室的未來還要靠你們，加油啦！然後是跟我一起奮鬥的志哲，在最後衝實驗的那段不見天日的辛苦日子還好有你的幫忙才能順利完成。另外還有畜產一哥天恩，還有兩年衝啊！畜產一姐易潔，還有N年衝啊！土壤實驗室的家齊和德偉，堅持下去快結束囉！環管實驗室的阿聖哥，感謝在熬夜做實驗時你的餅乾糖果支援。最後也最感謝的是我的家人，在難受時聽我抱怨給我心靈上的支持，讓我能安心的走完碩士這段路。

2015年8月6日 宥鈞於環微實驗室

## 摘要

在現今人類社會主要能源來源都是以化石燃料為主，但持續的開採會導致的化石燃料的短缺，面臨能源不足的危機，因此開發替代能源成了一項重要的目標。許多生活廢棄物或是農業廢棄物都含有豐富的纖維素，利用這些廢棄物將其轉換成再生能源，不只減少了廢棄物的排放量，同時還可以節省在原料上的成本。茶類飲品在台灣是普遍受到歡迎的飲料，而茶飲在製程中會產生出大量的廢茶葉渣，這些富含纖維素的茶葉廢棄物對暗醱產氫來說是很好的基質來源。本研究是使用廢棄茶葉渣為基質並以化學抑制劑抑制瘤胃液中的甲烷菌，再以反應曲面法找出最佳產氫發酵之條件。實驗結果證實，以二硝基乙醇進行甲烷菌抑制可以得到最好的效果，在 10 個世代馴養下沒有監測到甲烷的生成。在基質前處理部分，以熱水煮沸廢棄茶葉 30 分鐘做為產氫發酵基質可以改善產氫效果，產氫量增加至 1.13 mmol H<sub>2</sub>/ g COD。經反應曲面統計分析後，此微生物培養在 57°C、初始 pH 7.2、亞鐵離子濃度為 160 mg/L 及基質濃度 20 g/L 時可以得到最大產氫量 1.15 mmol H<sub>2</sub>/ g COD，其氫氣含量可達 19.54%。且經由菌群分析證實，使用 2NEOH 抑制能保留下非芽孢之產氫菌 *Thermohydrogenium kirishiense*。

關鍵字：氫氣、暗醱、廢茶葉、抑制劑

## Abstract

Today, most of the energy consumption worldwide is dependent on fossil fuels, leading to the depletion of limited fossil fuels reserve. Many municipal solid wastes (MSW) or agricultural wastes contain a great amount of cellulose, which provides plentiful organic substrates for biohydrogen production. Use of agricultural waste to product biofuel not only to solve the waste problem but also reduce the cost of renewable energy production. Tea is a popular daily beverage in Taiwan currently. Preparation of such beverage generates a significant amount of waste tea leaf, which is a cellulosic waste. Such great amount of waste tea leaves can be used for hydrogen production by using dark fermentation. The objective of this study was to investigate biohydrogen production from waste tea leaves by rumen microflora whose methanogenesis activity was inhibited by chemical inhibitor 2-nitroethanol (2NEOH). The experimental design method response surface methodology (RSM) was used to evaluate optimal conditions for hydrogen production. The results showed that 2NEOH had greatly reduced methane production after 10 successive subcultures. Boiling waste tea leaves in hot water for 30 minutes as substrate can improve hydrogen production with hydrogen production yield(HY) of 1.13 mmol H<sub>2</sub>/ g COD. With RSM, the culture optimal condition for hydrogen production was found at 57°C, pH 7.2, iron(II) concentration of 160 mg/L and substrate concentration 20 g/L with maximum hydrogen production yield 1.15 mmol H<sub>2</sub>/ g COD, hydrogen content was 19.54%. Community analysis by PCR-DGGE showed that an anaerobic thermophilic non-sporeforming bacterium *Thermohydrogenium kirishiense* was found in the mixed culture after treating with methanogenic inhibitor 2NEOH.

Keywords: Hydrogen, dark fermentation, waste leaf, inhibitor



# 目錄

第一章 前言 .....	1
1.1 研究動機 .....	1
1.2 研究目的 .....	3
第二章 文獻回顧 .....	4
2.1 能源現況 .....	4
2.2 生質能 .....	5
2.3 氫能 .....	6
2.4 產氫技術 .....	7
2.4.1 熱化學法 .....	7
2.4.2 電化學法 .....	8
2.4.3 生物法 .....	9
2.4.3.1 光合作用 .....	9
2.4.3.2 醱酵作用 .....	10
2.5 暗醱酵產氫機制 .....	16
2.6 暗醱酵產氫基質 .....	18
2.6.1 纖維素結構 .....	18
2.6.2 纖維素水解酵素 .....	19
2.7 產氫微生物 .....	20
2.8 暗醱酵產氫之影響因子 .....	24
2.8.1 溫度 .....	24
2.8.2 pH .....	24
2.8.3 鐵、鎳離子濃度 .....	24
2.9 甲烷菌抑制 .....	27
2.10 茶葉 .....	29



2.10.1 茶多酚.....	30
2.11 反應曲面法 .....	30
2.11.1 反應曲面原理 .....	31
2.11.2 二水準因子設計 .....	33
2.11.3 陡升路徑法 .....	33
2.11.4 中心混成實驗 .....	34
第三章 材料與方法.....	35
3.1 實驗流程設計 .....	35
3.2 菌株來源 .....	36
3.3 菌種培養 .....	37
3.3.1 厭氧操作 .....	37
3.3.2 嗜熱厭氧培養基 .....	38
3.3.3 甲烷生成抑制 .....	40
3.3.4 基質來源 .....	40
3.3.5 基質前處理 .....	40
3.4 環境影響因子 .....	41
3.4.1 溫度 .....	41
3.4.2 基質濃度 .....	42
3.4.3 pH .....	42
3.4.4 亞鐵離子 .....	42
3.5 分析方法 .....	43
3.5.1 纖維素分析 .....	43
3.5.4 茶葉 COD 分析 .....	45
3.5.5 茶多酚濃度分析 .....	45
3.5.2 蛋白質濃度分析 .....	46

3.5.3 還原糖濃度分析.....	46
3.5.6 氣相產物分析.....	47
3.5.7 液相產物分析.....	48
3.5.8 產氫模式分析.....	48
3.6 菌相分析.....	49
3.6.1 DNA 萃取.....	49
3.6.2 DNA 濃度與純度檢測.....	49
3.6.3 洋菜膠電泳.....	50
3.6.4 聚合酶鏈狀反應.....	50
3.6.5 變性梯度膠體電泳.....	52
3.6.7 親緣分析.....	54
3.7 RSM 實驗設計.....	55
第四章 結果與討論.....	57
4.1 基質成份組成分析.....	57
4.2 嗜熱菌種之培養.....	58
4.3 甲烷菌抑制.....	60
4.4 環境影響因子.....	63
4.4.1 不同溫度對水解產氫之影響.....	63
4.4.2 不同 pH 值對水解產氫之影響.....	66
4.4.3 不同基質濃度對水解產氫之影響.....	69
4.4.3 不同亞鐵離子濃度對水解產氫之影響.....	72
4.5 基質前處理.....	74
4.5.1 微波消化、酸處理.....	74
4.5.2 茶多酚抑菌測試.....	78
4.5.3 熱處理.....	78

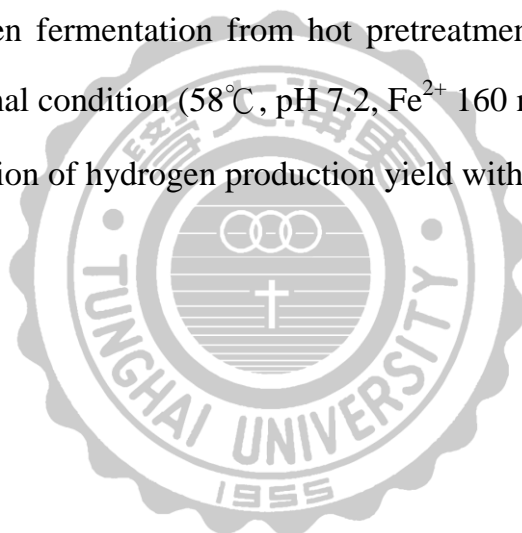
4.6 反應曲面最佳化 .....	82
4.6.1 實驗因子與設計範圍 .....	82
4.6.2 中心混成實驗結果 .....	82
4.6.3 培養條件最佳化 .....	85
4.6.4 反應最佳化驗證 .....	89
4.7 微生物族群分析 .....	92
4.7.1 變性梯度凝膠電泳族群分析 .....	92
4.7.2 微生物菌相親緣分析 .....	94
第五章 結論與建議 .....	97
5.1 結論 .....	97
5.2 建議 .....	98
參考文獻 .....	99
附錄 .....	112



## 表目錄

Table 2.1 Compare different biohydrogen production process.....	15
Table 2-2 Hydrogen production from various substrates by using rumen microflora.....	23
Table 2-3 The design table of 2 <sup>3</sup> factors.....	33
Table 3-1 Basal composition of thermophilic anaerobic medium .....	38
Table 3-2 Composition of trace element solution .....	39
Table 3-3 Composition of vitamin solution.....	39
Table 3-4 Relationship of initial pH and NaHCO <sub>3</sub> concentration.....	42
Table 3-5 Component of neutral detergent (ND) solution .....	44
Table 3-6 Component of acid detergent (AD) solution.....	44
Table 3-7 Agarose gel concentration for DNA fragments .....	50
Table 3-8 PCR primer use for 16S rDNA.....	51
Table 3-9 Temperature program in PCR reaction .....	51
Table 3-10 Reagent concentration in PCR reaction.....	51
Table 3-11 Reagent of polyacrylamide gel .....	52
Table 3-12 Experimental design for optimizing fermentative hydrogen production .....	56
Table 4-1 The compositions of different hydrogen production feedstock .....	63
Table 4-2 Comparison of substrates hydrolysis and hydrogen production at different temperature.....	64
Table 4-3 Comparison of substrates hydrolysis and hydrogen production at different pH's .....	67
Table 4-4 Comparison of substrates hydrolysis and hydrogen production at different substrates concentration .....	70
Table 4-5 Comparison of substrates hydrolysis and hydrogen production at	

different ferrous ions.....	72
Table 4-6 Effect of different dilution factor with add tea polyphenols and no addition .....	78
Table 4-7 Effect of different boiling on releasing polyphenols from wast tea leaves.....	79
Table 4-8 Biohydrogen production by using boiled waste tea leaves as substrate. Raw waste tea leaves withing boiling was used as control .....	79
Table 4-9 Experiment design and experimental results for hydrogen production .....	84
Table 4-10 Hydrogen fermentation from hot pretreated waste tea leaves under optimal condition (58°C, pH 7.2, Fe <sup>2+</sup> 160 mg/L) .....	89
Table 4-11 Comparson of hydrogen production yield with other study .....	91



## 圖目錄

Fig 2-1 World carbon dioxide emissions from fossil fuels since 1965.....	5
Fig 2-2 Direct biophotolysis of green algae or cyanobacteria.....	11
Fig 2-3 Photo-fermentation processes by photosynthetic bacteria. ....	11
Fig 2-4 Schematic representation of the anaerobic dark fermentation digestion process.....	14
Fig 2-5 Hydrogen production pathway in <i>Clostridium sp</i> , Fd, ferredoxin; H <sub>2</sub> ase, hydrogenase; Fhl, formate hydrogen lyase. ....	17
Fig 2-6 Structure of cellulose (A) single cellulose fiber showing $\beta$ -1,4 glycosidic linkage of glucose molecules (B) Cellulose fibres showing crystalline and amorphous areas. ....	18
Fig 2-7 Cellulose microfibrils in plant cell walls.....	19
Fig 2-8 Structure of hydrogenase.....	26
Fig 2-9 Schematic of inhibition by chemical inhibitors. ....	27
Fig 2-10 Structures of Coenzyme M (a) and BES (b). ....	28
Fig 2-11 Process flowchart of response surface.....	32
Fig 2-12 Response surface of two variance system. ....	33
Fig 2-13 Schematic diagram for central composite design.....	34
Fig 3-1 Schematic flowchart of experimental design. ....	35
Fig 3-2 Schematic diagram of rumen tube and collection from dairy cattle. ...	36
Fig 3-3 Schematic diagram of Hungate gas station. ....	37
Fig 3-4 Schematic diagram of determines biogas volume.....	47
Fig 3-5 Sequence reference points of T&A™ Cloning Vector. ....	54
Fig 3-6 Multiple cloning site sequences of T&A™ Cloning Vector.....	54
Fig 4-1 Composition of tea leaves fiber. Cell contents included soluble carbohydrates, proteins, lipids, minerals and vitamins.....	57

Fig 4-2 Biodegradation of waste paper by thermophilic anaerobic microorganisms from rumen fluid. ....	58
Fig 4-3 Cumulative biogas production by rumen bacteria. (a) microbial growth, (b) cumulative biogas production, (c) daily pH, (d) soluble metabolic, Culture were incubate at 55°C with 5 g/L waste paper. In this experiment, hydrogen production are less than methane.....	59
Fig 4-4 Inhibition effect of various inhibitors on methanogenesis by rumen mixed flora (a) cumulative hydrogen production, (b) cumulative methane production, (c) microbial growth, (d) daily pH, (e) soluble metabolic, (f) reducing sugar. Cultures were incubated at 55°C with 5 g/L waste paper. ....	62
Fig 4-5 Effect of temperature on biohydrogen fermentation, (a) microbial growth, (b) cumulative hydrogen production, (c) daily pH, (d) reducing sugar, (e) soluble metabolic, (f) hydrogen yield and hydrogen production rate. Culture were incubate with 5g/L waste tea leaves. ..	65
Fig 4-6 Effect of different pH's on biohydrogen fermentation, (a) microbial growth, (b) cumulative hydrogen production, (c) daily pH, (d) reducing sugar, (e) soluble metabolic, (f) hydrogen yield and hydrogen production rate. Culture were incubate at 60°C .....	68
Fig 4-7 Effect of different substrates concentrations on biohydrogen fermentation, (a) microbial growth, (b) cumulative hydrogen production, (c) daily pH, (d) reducing sugar, (e) soluble metabolic, (f) hydrogen yield and hydrogen production rate. Culture were incubate with pH 7 at 60°C .....	71
Fig 4-8 Effect of Fe <sup>2+</sup> concentration on biohydrogen fermentation, (a) microbial growth, (b) cumulative hydrogen production, (c) daily pH, (d)	

reducing sugar, (e) soluble metabolic, (f) hydrogen yield and hydrogen production rate. Culture were incubate with pH 7 at 60°C .....	73
Fig4-9 Production of reducing sugar from pretreatment of waste tea leaves by (a) microwave treatment, (b) acid treatment.....	75
Fig 4-10 SEM image of (a) no pretreatment (magnification 150×) waste tea, (b) pretreatment form acid at 45 mint (magnification 1500×), (c) pretreatment by acid at 45 mint (magnification 1000×), (d) pretreatment by microwave at 8 mint (magnification 400×).....	76
Fig4-11 Effect of different pretreatment on biohydrogen fermentation (a) microbial growth, (b) cumulative hydrogen production, (c) daily pH, (b) reducing sugar, (e) soluble metabolic, (f) hydrogen yield and hydrogen production rate. Culture were incubate with 20 g/L substrate at 60°C .....	77
Fig 4-12 SEM image of (a) no pretreatment (magnification 400×) waste tea, (b) pretreatment form hot water at 30 min (magnification 400×). .....	80
Fig 4-13 Effect of heating pretreatment of waste tea leaves on hydrogen fermentation, (a) microbial growth, (b) cumulative hydrogen production, (c) daily pH, (b) reducing sugar, (e) soluble metabolic, (f) hydrogen yield and hydrogen production rate. Culture were incubate with 20 g/L substrate at 60°C .....	81
Fig 4-14 Result of normal probability plot, the experiment response is hydrogen yield. Those experiment data (point) roughly in a straight line, it means have normally distributed data. ....	85
Fig 4-15 Response surface plot and contour plot showing the effect of the temperature and initial pH on hydrogen yield. ....	86
Fig 4-16 Response surface plot and contour plot showing the effect of the iron	



concentration and initial pH on hydrogen yield.....	87
Fig 4-17 Response surface plot and contour plot showing the effect of the iron concentration and temperature on hydrogen yield.....	88
Fig 4-18 Optimal condition on hydrogen production, (a) microbial growth, (b) cumulative hydrogen production, (c) daily pH, (d) reducing sugar, (e) soluble metabolic, (f) gompertz equation. Culture were incubate with pH 7.2, 58°C and iron concentration were 160 mg/L. ....	90
Fig 4-19 Agarose gel electrophoresis analysis of 16S rDNA. Agarose gel concentration 1.5%, Marker 100-3000 bp. Land 1: Marker, Land 2: 2NEOH, Land 3: Rumen.....	92
Fig 4-20 Microbial community structure analyses from inhibition and no inhibition at 6 day culture. Denaturing gradient range from 35 to 45%. ....	93
Fig 4-21 Phylogenetic analysis of DGGE fragments from micro flora after 2NEOH inhibition. The dendrogram of the interrelationship was constructed by using maximum likelihood method. Bootstrap replication values calculated from 500 times. ....	96
Fig 4-22 Phylogenetic analysis of no DGGE fragments from micro flora without 2NEOH inhibition. The dendrogram of the interrelationship was constructed by using maximum likelihood method. Bootstrap replication values calculated from 500 times. ....	96

## 第一章 前言

### 1.1 研究動機

自工業革命開始以來人類社會快速發展，以化石燃料 (Fossil fuel) 為主的能源大量的被使用在各種用途之上。但是過度的開採使用，使得天然氣、煤、石油等化石燃料使用年限快速的驟減，在未來勢必會面臨到化石燃料枯竭的危機。與此同時，燃燒化石燃料後產生的大量溫室氣體導致環境汙染問題，為了解決這些問題，尋找潔淨、可再生的替代能源是必須且迫切的。台灣因為受到狹小的地形限制，大約 98% 的能源都需仰賴國外進口來補足，除了傳統的火力發電之外，還需多發展像是水力、風力、地熱、太陽能、潮汐能、生質能等再生能源來替代逐漸枯竭的化石燃料。

生質能 (Bioenergy) 又稱生物燃料、生質燃料 (Biofuel)，是泛指利用有機物或將生物質轉換成固體、液體或氣體等可以直接利用的燃料。生質能具有可再生性，可以利用有機廢棄物轉化而成，作為替代燃料使用不僅解決了能源問題，同時也達到廢棄物減量，可說是環保又兼具經濟價值。據行政院農委會農糧署 2014 年度統計，台灣每年約產生 460 萬噸農業廢棄物，其中農產、畜產廢棄物就高達 420 萬噸。農業廢棄物的組成以植物纖維素為主，纖維素是由醣鏈所構成之聚合物，一旦經過微生物水解後就能很輕易的將其轉換成生質燃料，這些富含纖維素的廢棄物也就提供了一個良好生質能源原料的管道。

在生質能源中，氫能是一個被視為可以真正永續發展的能源，因為氫氣的能量高，在燃燒的時候可以產生約 142 MJ/kg 的高熱值 (低熱值為 122 MJ/kg)，遠遠高於汽油的 48 MJ/kg，並且燃燒後的副產物只有水，不造成任何危害環境的物質。目前製氫的主要方法可分為三大類：電化學法 (Electrolysis)、熱化學法 (Thermolysis) 以及生物法 (Biohydrogen)。前面兩種是目前在工業應用上的主要產氫技術，但在這兩者在製程中皆會消

耗化石燃料且在極端環境下操作，對於環境永續發展並不是一個良好的長久之計。生物產氫是利用微生物發酵或是光合作用，在微生物生長代謝的過程中自然的生產，比起前面兩種方法相對的環保，可以真正達到解決能源問題，對環境的負擔也較低。

飲茶對台灣來說是一項很重要的文化，在街道上隨處可見各式各樣的飲品店，而這些飲品不外乎是由茶葉為基礎而衍生出來，各大商店裡也充斥著各種茶類飲品。茶葉在台灣種植的總面積為 13486 公頃，每年可收成約 15000 噸的茶葉，但這些產量仍不足以滿足台灣市場的需求，根據行政院農業委員會農糧署統計，在 2014 年度就從國外進口了 25000 噸的茶葉。統計至 2012 年的數據顯示，台灣現調冷飲店已經約有 14900 間左右，一般飲料店平均每日會生產出 700 公斤的廢茶渣，換算下來每日全台灣的冷飲店就產生了 10430 噸的廢棄物。飲料店生產出的廢茶葉大部分都是交由清潔隊直接清運至焚化廠做焚化處理，而這些茶渣因為含水量高，會降低焚化爐的熱值，使得焚化爐燃燒溫度會花較長時間到達需求溫度，延長焚化時間。

廢茶葉含有著豐富的纖維素，對於暗發酵生物產氫來說是個很理想的基質來源，將這些廢棄茶葉收集並且加以利用，不僅減輕了垃圾處理的負擔，同時也兼顧了環境永續發展。

氫氣在厭氧代謝中僅做為中間產物而存在，若不將甲烷菌(Methanogens)加以抑制氫氣會被其利用消耗殆盡，使得產量降低。一般在傳統篩選菌株上普遍使用熱處理的方式，保留能產生內孢子同時能產氫氣的 *Clostridium sp.* 之微生物，此方式只篩選留下產孢菌，但像是 *Enterobacter sp.* 之不產孢之產氫菌也會被去除，若能兩者都保留下也可期望將產氫量提升。

## 1.2 研究目的

本研究是使用東海牧場採取的乳牛瘤胃液培養之菌種，利用添加化學抑制劑之方法針對瘤胃液中的甲烷菌進行抑制，保留其它能夠水解纖維素和產生氫氣的菌株，並且以使用過的廢棄茶葉渣為基質進行各種培養條件優化，並且分析其微生物族群變化，最後再以反應曲面法 (Response surface methodology, RSM) 進行分析，找出最適化產氫條件。



## 第二章 文獻回顧

### 2.1 能源現況

伴隨著人類社會的發展過程中，燃料一直都是不可或缺的重要角色，由其從工業革命開始之後，需要靠燃煤運作的蒸氣機大量的被使用在各種工業用途之上，開啟了往後對能源使用上的變革。然而化石燃料（煤、石油及天然氣）是屬於不可再生的能源，自 18 世紀開始大量使用至今，地球上所蘊含的能源已經所剩不多，經英國能源公司 BP 統計，石油和天然氣剩下不到 60 年的開採年限，煤炭稍長一點還尚可以開採 110 年 (British Petroleum, 2014)。根據美國能源資訊屬統計結果顯示，近十年來每年度全球對化石燃料的生產量增加了約 13 千萬億英熱單位，也就是說平均每年增加了 1.3 千萬億英熱單位的生產量，雖然即將面臨到存量不足的危機，但是整個社會對於化石燃料的需求還是逐年增加沒有減少。

化石燃料除了蘊含量即將不足的問題之外，燃燒的化石燃料也產生了許多威脅到環境的問題。化石燃料在燃燒的時候會排放出氣狀污染物如硫氧化物 ( $\text{SO}_x$ )、氮氧化物 ( $\text{NO}_x$ )、碳氧化物 ( $\text{CO}_x$ )、碳氫化合物 ( $\text{C}_x\text{H}_x$ )、重金屬及其他有機化合物，這些物質溢散到大氣中會造成酸性沉降，對人體、環境都有直接的危害。另外二氧化碳也造成了全球暖化的問題，隨著石油、煤及天然氣的使用量增加二氧化碳也隨之增量 (Fig 2-1)，受到溫室效應的影響全球地表溫度不斷的上升，冰川溶化、海平面上升以及氣候變遷，已經嚴重影響了人類生存。

為了因應將來的能源危機以及環境永續發展的考量，積極發展潔淨、永續、可再生的能源以代替目前的化石燃料是重要的未來趨勢。再生能源是來自大自然的資源，是從自然界的循環中不斷的循環補充，可說是取之不盡、用之不竭的能源，例如太陽能、風能、潮汐能、地熱能及生質能等。

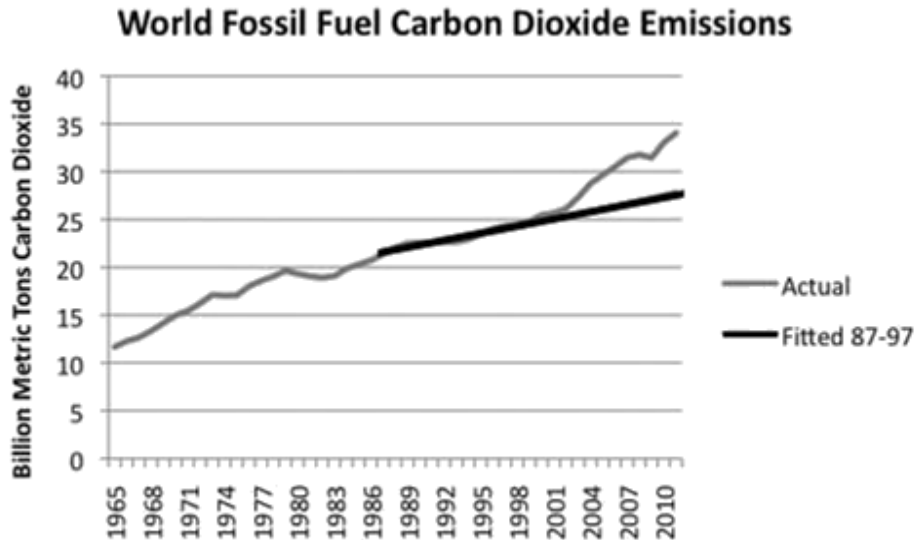


Fig 2-1 World carbon dioxide emissions from fossil fuels since 1965 ( British Petroleum, 2014 ) .

## 2.2 生質能

生質能是指利用有機物質或生物質轉換成能源的能源，其轉換成為能源的形態包含了可以直接燃燒的固態或是經由醱酵、萃取後取得的液態和氣態。目前生質能已經發展了三個世代：第一代生質能源(First generation) 是使用含澱粉 (Starch)、醣類 (Sugar) 之可食用的作物例如玉米、甘蔗這類農作物轉換成生質乙醇，這些作物因為含醣量豐富所以可以很容易的轉換成能源，但因為將糧食作物作為能源產物會發生與民爭糧的問題，因而導致糧價上漲，為了解決這個衝突，又逐漸發展出了第二代生質能。第二代生質能源 (Second generation) 主要是使用纖維素 (Cellulose)，將一些富含纖維素的農林、都市廢棄物轉換為能源，不僅原料來源充足且成本低廉，同時解決了廢棄物的問題，可以說是目前最環保的一種方法。第三代生質能源 (Third generation) 是利用微藻繁殖快速又易於培養的特性，培養出大量後獲取生物質，或從中提煉生質酒精、油脂等產物 (UNEP, 2009)。

## 2.3 氫能

氫氣是一種無色無味的可燃性氣體，在燃燒時可以產生的熱值約為 142 MJ/kg，為汽油的三倍左右。由於氫氣在燃燒時不會排放二氧化碳，燃燒完的副產物只有水而已 (Lay *et al.*, 2013)，對於環境來說是非常友善的一種燃料，不管是做為運輸燃料亦或是發電使用來說都是很好的能源載體。氫氣因為高熱值的特性、燃燒後零污染排放及能夠永續的使用這三項特點使得近幾年來備受矚目，在即將面臨能源危機的現在，被視為非常有潛力的替代能源，各國都將氫能視為重點發展技術，以因應未來的能源需求。

氫氣除了直接燃燒使用之外，還可以配合燃料電池做為動力，透過氧氣與氫氣進行氧化還原反應產生熱能，進而發電推動汽車。目前燃料電池已經被各大汽車製造商視為主流技術，不斷在研發改良燃料電池車之技術。德國汽車公司奧迪 (Audi) 在 2015 年公布了一款使用燃料電池發動的跑車 A7 Sportback h-tron quattro，此輛車在注滿氫氣後可以行駛 500 公里，最高時速可達 180 km/h，性能與一般汽車無異，且排放的副產物僅只有水而已。

氫氣生產的技術已經逐漸發展成熟，在製程上可以透過許多方式來進行，其原料來源可以使用再生性以及非再生性，生產製造上較為環保。但氫氣在生產成本上仍然偏高，難以達到經濟效益，除此之外氫氣由於密度小以及沸點低，在儲存以及運送過程中也面臨到問題，在儲存上需要先將氫氣加壓成液體，再以特殊的金屬合金保存，但同樣的在這過程中也較耗能昂貴 (蘇，2013)。為了能將氫能迅速的普及使用，在生產成本上就是一個很重要的考量，如何有效率及低成本的生產氫氣也是目前所面臨的問題。

## 2.4 產氫技術

目前在工業上生產氫氣的方法可依照生產的不同方式分類為三大類：熱化學法、電化學法及生物法。熱化學及電化學能生產出大量且氫氣純度較高，但這兩種方法在製程中皆花費較多額外能量輔助生產。生物法在製造過程是藉由微生物轉化而成，產生出的氫氣純度及產量由微生物總類以及基質原料決定，配合最適馴養條件也能將氫氣產量提升大到最大，在製程中只需花費培養微生物之能源，比起化學反應相對的耗能低也廉價。

### 2.4.1 熱化學法

熱化學法是一般傳統製氫的方法也是目前主要的產氫技術，主要是使用化石燃料做為反應的原料，在製程中需要使用較高的溫度將原料氣化分解，此方法既需要使用化石燃料也會排放出汙染物，較不符合環境永續發展之宗旨：

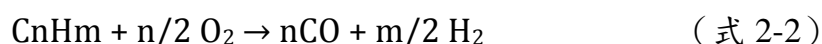
#### 1. 氣化反應 (Gasification)

氣化反應是一種把煤炭、石油或是生物質等有機原料，經由控制溫度 (700 ~1600°C) 及氧氣量 (0 ~ 42%) 使這些物質與水蒸氣反應轉換成氫氣和一氧化碳 (呂, 2009)。此種方法可以將原本的燃料轉換成效率更高的氣體，在原料的供給上也不受限制，幾乎所有的有機物都可以利用，式 2-1 為產生氫氣之反應式。



#### 2. 部分氧化法 (Partial oxidation)

部分氧化法是將天然氣或是烴燃料經過不完全燃燒後生成氫氣與一氧化碳的反應。原料方面來源廣泛，從天然氣到煉油後的殘油都可以被直接使用。





### 3. 蒸氣重組法 (Steam reforming)

蒸氣重組法是利用蒸氣與低碳素的化石原料反應後產生氫氣與二氧化碳，是目前廣泛用於工業上最有效率產生氫氣的一個製程，反應過程如下：

合成氣生成反應：



水氣轉化反應：



總反應：

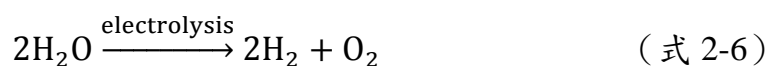


### 2.4.2 電化學法

電化學法是以水為原料，利用電能將水分解成氫氣和氧氣的一種技術，此方法所得到的氫氣濃度高、水轉換氫的效率可達 75% - 85%，製造過程簡單且無污染物的排放：

#### 1. 電解法 (Water splitting by electrolysis)

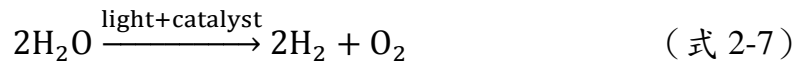
電解法是以直流電直接電解水，氫氣與氧氣會分別出現在電池的負極和正極兩端，使用此種方法可以得到純度較高之氫氣，但耗電量高不具成本效益，且所需之總能量會隨著反應溫度升高而增加，反應如式 2-6。



#### 2. 光電解法 (Photoelectrochemical water splitting)

水光電解是將太陽能轉換成為化學能的一種方法，通常是利用可光觸媒的半導體材料。光觸媒表面吸收太陽能後作用於兩端電極，生成氫氣跟

氧氣 (IPPC, 2007)，與電解法相較起來不需要輸太多電能運作，反應式如式 2-7。



### 2.4.3 生物法

有別於熱化學以及電化學法，以生物的方法來產氫不需要花費太多額外能源在製程中輔助製造氫氣，它可以在常溫的條件下進行反應，原料來源豐富充沛，大部分的有機物都可以被利用，成本比起來相對的也比較低廉，同時還可以利用各種有機廢棄物像是市政廢棄物、農業廢棄物等，產生能源的同時亦可以減輕廢棄物的產量。

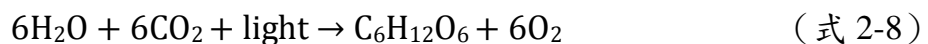
#### 2.4.3.1 光合作用 (Photosynthesis)

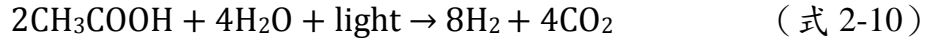
##### 1. 直接光解 (Direct biophotolysis)

直接光解是綠藻或是藍綠菌藉由光合作用系統直接將光能轉換成氫氣的一種過程 (Fig 2-2)，微生物透過光合系統 PS I 和 PS II 吸收太陽能後，分解水分子來產生氫氣。此方法的優點是即使在低光源以及厭氧的條件下，綠藻仍然能將 22% 的光能轉換成氫氣 (Azwar *et al.*, 2014)。

##### 2. 間接光解 (Indirect biophotolysis)

間接光解是藉由微藻和藍綠菌，利用日夜交替或是不同反應器，使反應能個別進行產生氧及產生氫氣的過程。該反應可依照對光能的需求分成兩個部份來進行，在第一個步驟中，微生物會先使用光能，利用光合作用系統將水轉換成氧氣 (式 2-8)，接著電子被傳遞至質子藉由 nitrogenase 及 hydrogenase 產生氫氣，在系統作用時 CO<sub>2</sub> 被做為中間產物被進行固定及釋放，其反應式如式 2-9~10 (Azwar *et al.*, 2014)：

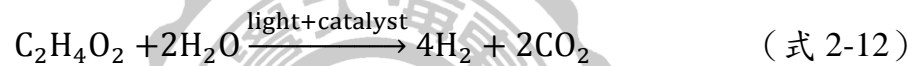




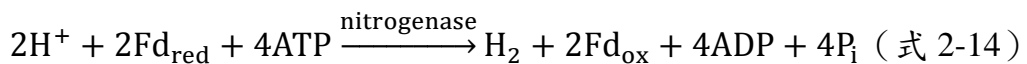
### 2.4.3.2 醱酵作用 (Fermentation)

#### 1. 光醱酵

光醱酵是透過光合細菌直接將太陽光能作為能源，將有機物轉換成氫氣和二氧化碳的一種醱酵過程。光醱酵主要是以紫非硫菌 (Purple Non-Sulfur bacteria, PNS) 為主，它可以在缺氧或是厭氧的條件在之下以太陽光為能源，將有機物 (如葡萄糖或乙酸等) 進行分解後產生氫氣，反應如 Fig 2-3 及 2-11 及式 2-12 (柯與馬, 2006) :



紫非硫菌含有 nitrogenase 以及 hydrogenase 兩種酵素來產生氫氣，nitrogenase 在固氮的同時也會產生氫氣，是紫非硫菌主要的產氫酵素，其產氫反應式分別如式 2-13 及式 2-14 (Azwar *et al.*, 2014) :



$\text{Fd}_{\text{red}}$  : reduced ferredoxin

$\text{Fd}_{\text{ox}}$  : oxidized ferredoxin

$\text{P}_i$  : phosphate

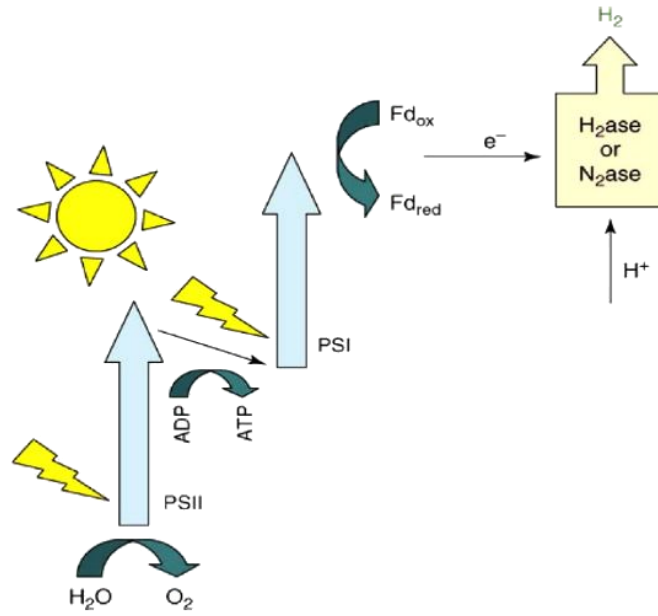


Fig 2-2 Direct biophotolysis of green algae or cyanobacteria. ( Azwar *et al.*, 2014 ) .

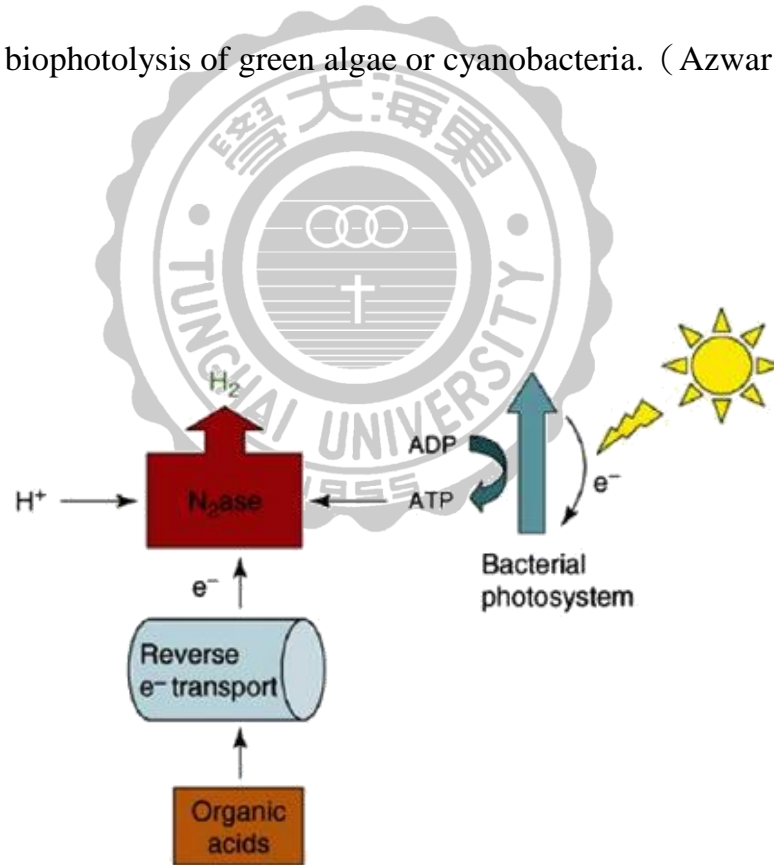
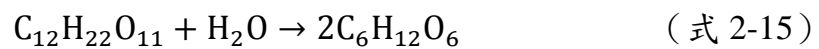


Fig 2-3 Photo-fermentation processes by photosynthetic bacteria ( Azwar *et al.*, 2014 ) .

## 2. 暗醱酵

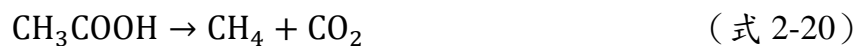
暗醱酵是在黑暗無氧的情況之下，靠著多種不同微生物菌群，將有機物轉換成氫氣、甲烷及二氧化碳的反應，在整個反應中涉及了三個不同步驟，分別為水解（Hydrolysis）、酸化（Acidogenesis）和甲烷化（Methanogenesis）。在醱酵過程時，微生物會先將結構複雜的有機物水解成氨基酸、單醣及脂肪酸，此階段即為水解，式 2-15 為蔗糖水解成葡萄糖的反應式：



接著微生物再利用這些產物將其轉換成短鏈的揮發性脂肪酸如乙酸、丙酸、丁酸及醇類等，產酸的這個階段也就是酸化，同時在這個階段產氫菌也會將部分揮發性脂肪酸轉化成氫氣，式 2-16 及 2-17 為葡萄糖及乙醇轉換成氫氣的反應式（Osrttem, 2002）：



在最後的階段，甲烷菌會將這些酸類及氫氣利用轉換成甲烷和二氧化碳，這個階段即為甲烷化（式 2-18 至 20）（Verma, 2002）：



在整個代謝路徑之中，氫氣僅做為中間產物而存在，產生出來的氫氣馬上又會被甲烷菌以及醋酸菌消耗，使得氫氣產量減少（Fig 2-4），為了去除這些利用氫氣的微生物，一般傳統的熱處理是以加熱的方式來篩選出會

產生內孢子且產氫能力強如 *Clostridium. sp* 這類的微生物做為產氫的菌種 (Krupp and Widmann, 2009)。

Table 2.1 整理了生物產氫的優點及缺點。相比起光發酵，在暗發酵產氫的情況之下微生物生長速度較快，產氫速率也高於光發酵，而且不被光源限制無時無刻都可以進行反應，可以實現持續且較穩定的產氫環境。



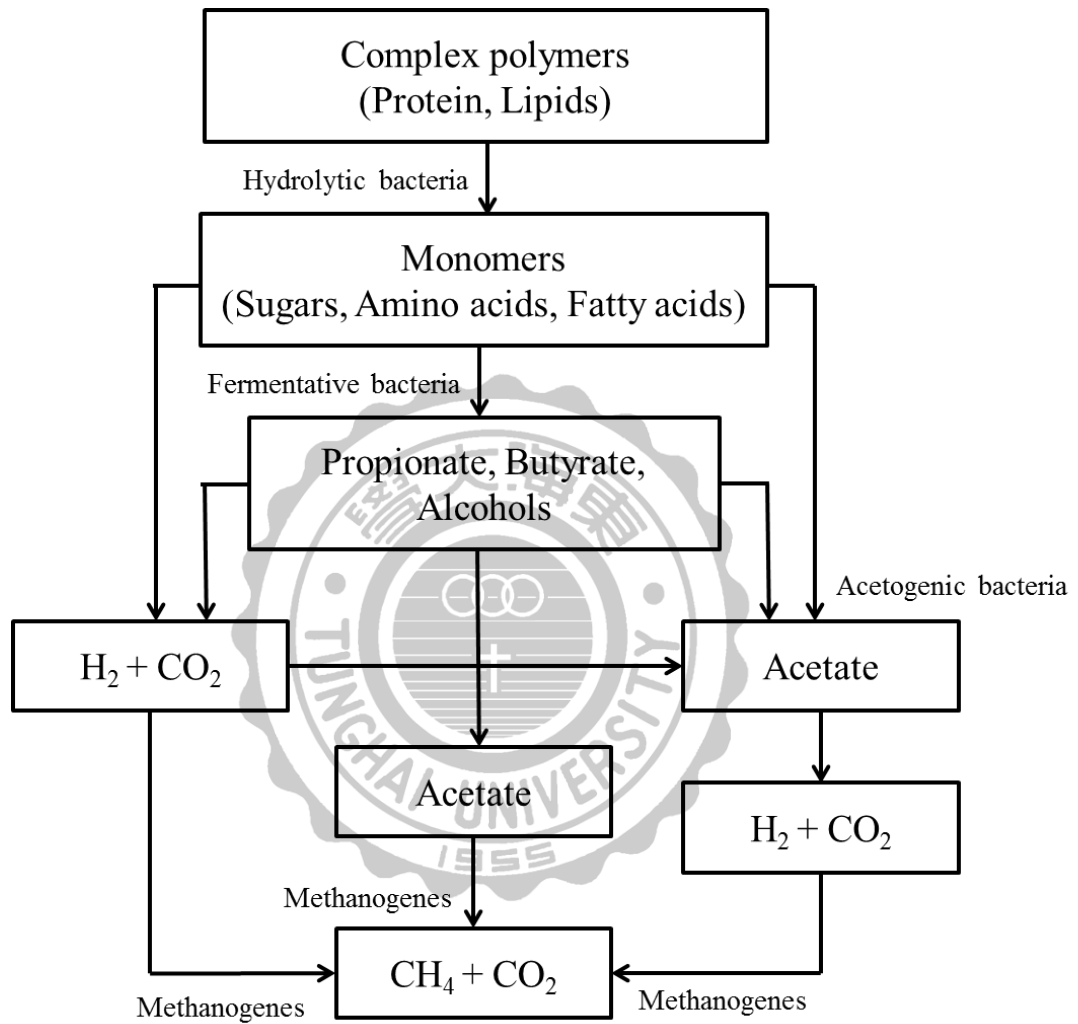


Fig 2-4 Schematic representation of the anaerobic dark fermentation digestion process.

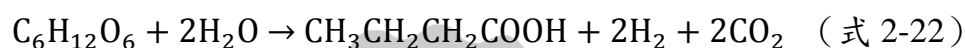
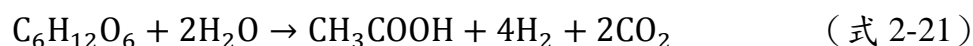
Table 2.1 Compare different biohydrogen production process

Type	Process	Advantages	Disadvantages
Photosynthesis	Direct biophotolysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• H<sub>2</sub> can be produced directly from water and sunlight by Algae</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requires high intensity of light, low photochemical efficiency and is sensitive to O<sub>2</sub> inhibition</li> </ul>
	Indirect bio photolysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Cyanobacteria</i> produce hydrogen from water via the ability to fix N<sub>2</sub> from atmosphere</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uptake hydrogenates are to be removed</li> </ul>
Fermentation	Photo fermentation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wide spectral energy can be used by <i>Photosynthetic non-sulfur bacteria</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O<sub>2</sub> is inhibitory on nitrogenase enzyme and light conversion efficiency is low</li> </ul>
	Dark fermentation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produce H<sub>2</sub> without light by <i>Heterotrophic anaerobic bacteria</i></li> <li>• No oxygen limitations and produce several metabolites</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relatively lower H<sub>2</sub> yield, these reactions become thermodynamically unfavorable</li> </ul>



## 2.5 暗醱酵產氫機制

微生物在進行厭氧產氫醱酵的時候主要產生的揮發性脂肪酸主要為乙酸及丁酸，當代謝路徑主要產物為乙酸時，在理論上每莫爾葡萄糖可以產生出 4 莫爾的氫氣；在丁酸為主要產物時，每莫爾葡萄糖只能產生出 2 莫爾的氫氣。因此，在代謝的過程中偏向乙酸醱酵是較利於產氫的，這是因為一旦 NADH 累積走向 Butyryl-CoA 時，在這過程中會消耗掉 NADH，鐵氧化還原作用（Ferredoxin）只能生產出兩個 H<sup>+</sup>。



在 *Clostridium sp.* 中，以副產物作為區分主要產出乙酸的微生物如 *Clostridium thermolacticum* (Collet *et al.*, 2005)、*Clostridium ljungdahlii* (Younesi *et al.*, 2005) 和 *Clostridium phytofermentans* (Warnick *et al.*, 2002)，能產出乙酸及丁酸的微生物有 *Clostridium butyricum* (Yokoi *et al.*, 1998)、*Clostridium cellulovorans* (Sleat *et al.*, 1984)、*Clostridium baratii* (Cato *et al.*, 1982) 和 *Clostridium cochlearium* (Laanbroek *et al.*, 1979)，以及主要產丁酸的微生物 *Clostridium herbivorans* (Varel *et al.*, 1995) 和 *Clostridium kluyveri* (Schoberth *et al.*, 1969)。

*Clostridium sp.* 分解葡萄糖分子進行醱酵產氫的代謝路徑過程(Fig 2-5)，一開始先經由 EMP (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) 途徑進行糖解作用生成 Pyruvate 與 NADH，再經由 hydrogenase 與 ferredoxin 將 NADH 轉換成 NAD<sup>+</sup> 並且釋放氫氣，接著 Pyruvate 經酵素繼續反應轉換成 Acetyl-CoA，在這過程中再經由 hydrogenase 及 ferredoxin 反應，生成氫氣、二氧化碳及甲酸 (Mazzoli, 2012)。

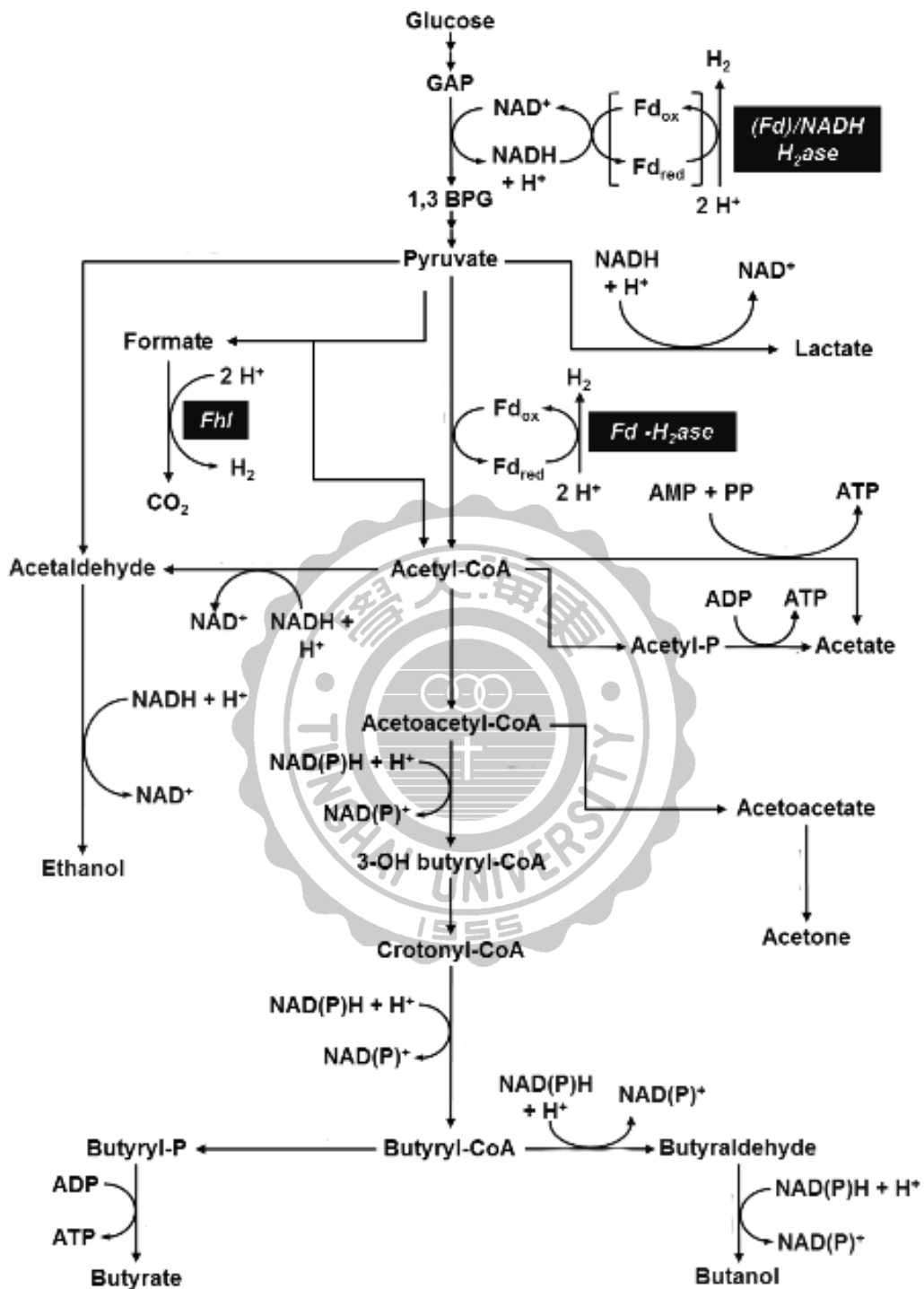


Fig 2-5 Hydrogen production pathway in *Clostridium* sp, Fd, ferredoxin; H<sub>2</sub>ase, hydrogenase; Fhl, formate hydrogen lyase (Mazzoli, 2012) .

## 2.6 暗醱酵產氫基質

### 2.6.1 纖維素結構

木質纖維素 (Lignocellulose) 是構成植物細胞壁的主要成分，是自然界最豐富的有機物，其主要為纖維素 (Cellulose)、半纖維素 (Hemicellulose) 及木質素 (Lignin) 三種成分所構成，其所含的比例會根據植物的種類不同而有所不同，例如棉花的纖維素含量就佔了 90%，而一般木本植物只佔了 40~50%。

纖維素是由葡萄糖單體並以  $\beta$  糖苷 ( $\beta$ -1,4 glycosidic) 鍵結而成的長鏈多醣聚合物，約由 8000 至 10000 個葡萄糖所構成，長鏈彼此之間則以氫鍵形成排列整齊的束狀結構結晶區 (crystalline area) 以及排列較鬆散的非結晶區 (amorphous area) 兩種型態如 Fig 2-6。

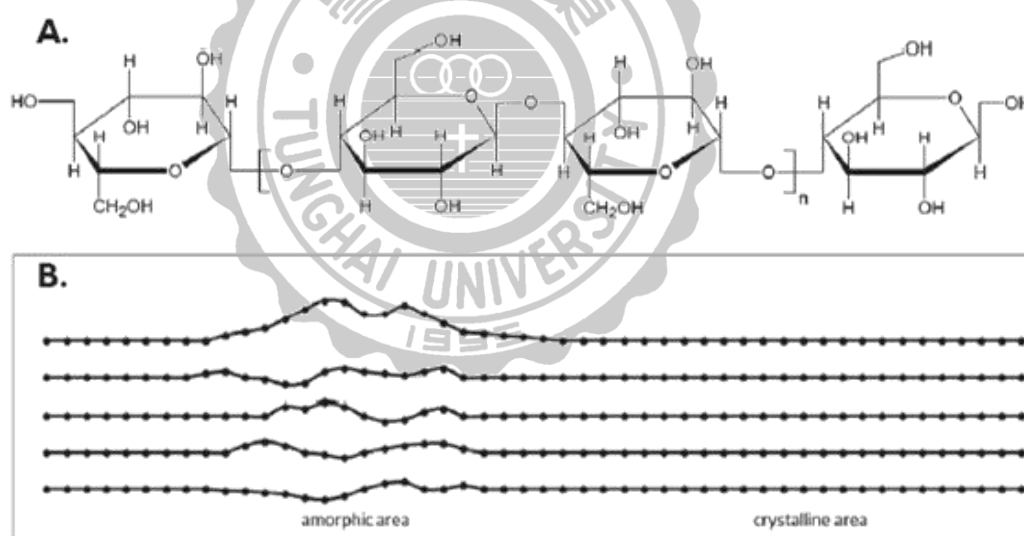


Fig 2-6 Structure of cellulose (A) single cellulose fiber showing  $\beta$ -1,4 glycosidic linkage of glucose molecules (B) Cellulose fibres showing crystalline and amorphous areas (Jaworska and Vogt, 2013) .

在植物細胞壁中的纖維素是被木質素和半纖維素層層包覆其中，形成一個緊實的結構 (Fig 2-7)，由於木質素結構頑強，在自然環境下較難以水解，使得纖維素在後續的利用上較為困難。木質素是由氧代苯丙醇以及其

它衍生物所構成的網狀高聚合物，也是維持植物硬度撐起植株重量的主要構造，在木本植物中木質素所占比例會比草本植物還來的高。一般來說會藉由物化方式如酸鹼處理、蒸氣爆破、超音波等等的方式來破壞木質素構造使纖維素裸露出來，以提升後續處理的效果。

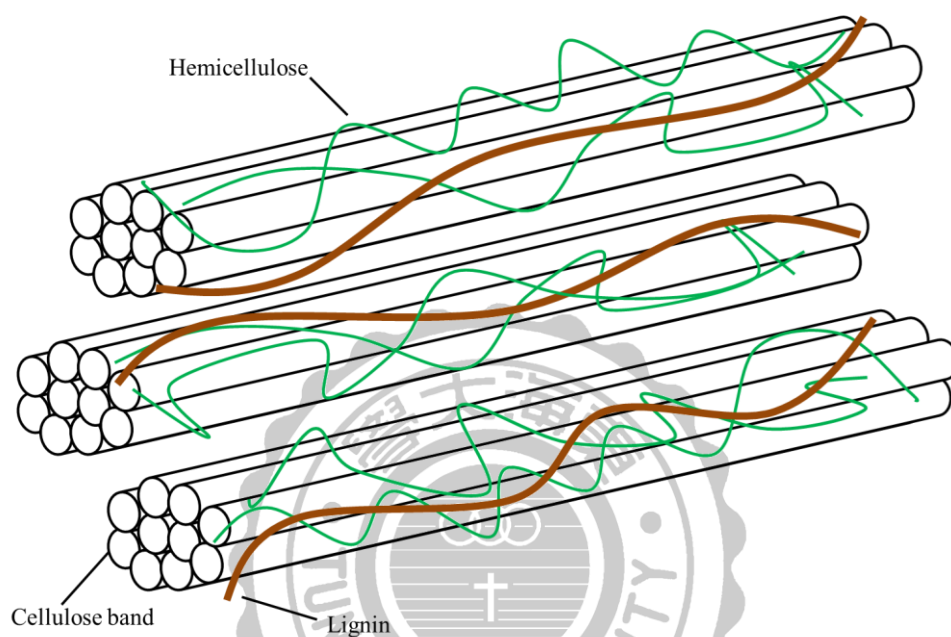


Fig 2-7 Cellulose microfibrils in plant cell walls (Lopez *et al.*, 2011) .

## 2.6.2 纖維素水解酵素

纖維素水解是由三種酵素之間彼此作用在不同區域，共同產生水解纖維素的作用，這些水解酵素可以依照不同作用位置分為三類:內切型纖維素水解酵素 (Endo-1-4- $\beta$ -D-glucanase)、外切型纖維素水解酵素 (Exo-1-4- $\beta$ -D-glucanase)及  $\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -glucanase)。

### 1.內切型纖維素水解酵素:

內切型纖維素水解酵素主要是任意作用在纖維素結構中的非晶型區域，它能將連結纖維素長鏈的  $\beta$ -1,4-糖苷鍵切斷，使纖維素形成較短的葡萄糖分子。

## 2. 外切型纖維素水解酵素:

外切性纖維素水解酵素主要作用在纖維素尾端的晶型結構區域，其又可以依照作用位置分為作用在還原端的 Cellobiohydrolyase I (CBHI) 及作用在非還原端的 Cellobiohydrolyase II (CBHII)，將內切型纖維素水解酵素切下的短鏈葡萄糖分子再細切成纖維雙糖 (Cellobiose) 或纖維胡精 (Cellodextrin)。

## 3. $\beta$ -葡萄糖苷酶:

$\beta$ -葡萄糖苷酶主要是將水解後的纖維雙糖及纖維胡精再次水解，形成葡萄糖單一分子，以供微生物利用。

## 2.7 產氫微生物

在自然界中存在著許多可以產氫之微生物，而這些微生物又依照對氧氣的需求分為好氧、兼氧以及厭氧菌。

好氧產氫微生物：

### 1. *Bacillus*

是一種屬於革蘭氏陽性產芽孢之桿菌。Kumar 等從牛糞堆肥中分離出之 *Bacillus licheniformis* 可以在批次培養的狀態下以葡萄糖為基質在 24 小時轉換 13 L H<sub>2</sub>/mol glucose (Kumar *et al.*, 1995)。

兼氧產氫微生物：

### 1. *Escherichia coli*

*E. coli* 是種人體或動物腸道中普遍可見之微生物，是一種革蘭氏陰性、無產芽孢之短桿菌，可以經由 formate hydrogenlyase 作用將甲酸轉換成氫氣及二氧化碳。研究指出 *E. coli* 以葡萄糖為基質時可以轉換 0.91 mol

$\text{H}_2/\text{mol}$  glucose (Blackwood *et al.*, 1956)。

## 2. *Enterobacter*

是屬於腸桿菌科之一種革蘭氏陰性成棒狀之微生物，研究指出一株從土壤分離純化之菌株 *Enterobacter aerogenes* 可以在含有葡萄糖、蛋白胨及鹽的基質中產生  $0.21 \text{ L H}_2/\text{h/L medium}$  之氫氣 (Tanisho *et al.*, 1983)。

厭氧產氫微生物：

### 1. *Clostridia*

為革蘭氏陽性產芽孢之桿菌，在自然界中分布廣泛，常存在於土壤、人或是動物腸道中，經由熱處理能輕易篩選出，因此為目前普遍之厭氧產氫菌種來源。Chin 等人之研究，從含澱粉之工業廢水中分離之 *Clostridium acetobutylicum* 在以葡萄糖為基質時最大產氫量為  $2 \text{ mol/mol}$  glucose (Chin *et al.*, 2003)。從一個含蔗糖之連續暗醱酵反應槽中分離出之 *Clostridium butyricum* CGS2 在以澱粉為基質時可以產出  $9.95 \text{ mmol/g COD}$  之氫氣 (Chen *et al.*, 2007)。*Clostridium butyricum* ATCC19398 為從隻腸胃道中分離純化之產氫菌，在以葡萄糖為基質下可以產出  $1.8 \text{ mol/mol}$  glucose 的氫氣 (Lin *et al.*, 2007)。*Clostridium thermolacticum* 為從河邊土壤汙泥分離之產氫菌，在以乳糖為基質時可以產出  $3 \text{ mol/mol}$  lactose 之氫氣 (Collet *et al.*, 2004)。從厭氧汙泥中被分離出的 *Clostridium butyricum* CGS5 在以木糖為基質時可產出氫氣  $0.73 \text{ mol/mol}$  xylose (Lo *et al.*, 2008)。從糖廠廢水中分離之 *Clostridium* sp. 6A-5 在以  $16 \text{ g/L}$  glucose 為基質之下進行產氫發酵時，其最大產氫量為  $2.50 \text{ mol H}_2/\text{mol}$  glucose (Cai *et al.*, 2013)。*Clostridium cellulosi* D3 當以纖維素為基質時，可以產生出  $1.2 \text{ mol H}_2/\text{mol}$  glucose 的氫氣 (Cao *et al.*, 2010)。從厭氧汙泥中分離之 *Clostridium butyricum* CWBI1009 以  $5 \text{ g/L}$  glucose 為基質時可以產出  $1.69 \text{ mol H}_2/\text{mol}$  glucose 之氫氣 (Masset

*et al.*, 2010)。

## 2. *Methylophs*

*Methylophs* 是可以利用單碳化合物做為碳源生長之微生物。Kawamura 等人發現一株從淡水中分離之 *Methylomonas albus* BG8 以及 *Methylosinns trichosporium* OB3b 能在厭氧的條件下以甲烷為碳源生產氫氣，以甲酸為基質時可以在五小時間產氫量可以達到 2.45 和 0.61  $\mu\text{mol H}_2/\mu\text{mol formate}$  (Kawamura *et al.*, 1983)。

## 3. *Rumen Bacteria*

為生活在偶蹄類動物瘤胃中能夠水解纖維素並產生揮發酸及氫氣、二氧化碳之微生物。*Ruminococcus albus* 已被研究在以葡萄糖為基質時可以產生 2.37 mol  $\text{H}_2/\text{mol glucose}$  之氫氣 (Nadi and Sengupta, 1998)，一株從人類糞便分離出的 *Ruminococcus luti* 也被發現到以碳水化合物發酵時主要產物為氫氣、乙酸及琥珀酸 (Simmering *et al.*, 2002)

纖維素由於其結構穩固在自然的情況之下難以分解，需要依靠微生物的水解酵素作用輔助加速分解。一般以草食性為主的昆蟲、動物腸胃道中都富含能將纖維素分解的菌群，瘤胃是反芻哺乳動物消化器官中的第一個胃，它能不斷的將食物送回動物口腔中磨碎再送回胃裡，藉由反芻的動作和腸胃道內之醱酵微生物分解纖維素，共同作用之下幫助消化 (Hall and Silver, 2009)。瘤胃微生物是將草料水解轉換成為揮發性脂肪酸的主要關鍵，因此在學術上很多學者利用瘤胃腸胃道微生物的多樣性從中篩選能水解及產氫的微生物，Table 2-2 整理出目前將瘤胃腸胃道菌群應用在產氫醱酵上的成果。

Table 2-2 Hydrogen production from various substrates by using rumen microflora

Microbial source	Substrate	Hydrogen yield	Reference
Rumen fluid	cellulose (5 g/L)	0.14 mol H <sub>2</sub> /mol hexose	Nissilä <i>et al.</i> , 2011
Cattle manure	waste milk (40 g/L)	59.5 mL/g L VS	Lateef <i>et al.</i> , 2012
Cattle manure	sucrose (20 g/L)	0.67 mol-H <sub>2</sub> /mol sucrose	Nagamany Nirmalakhandan, 2011
Cattle manure	corn stalk (15 g/L)	129.2 ml/g	Fan <i>et al.</i> , 2008
Cow dung compost	corn stalk (20 g/L)	144.3 ml/g corn stalk	Song <i>et al.</i> , 2012
Cow dung compost	sucrose (14 g/L)	2.15 mol H <sub>2</sub> /mol glucose	Wu <i>et al.</i> , 2010
Cow manure	xylose (5.79 g/L)	0.56 mol/mol monosaccharide	Yokoyama <i>et al.</i> , 2007
Cow manure	cellobiose (6.6 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



## 2.8 暗醱酵產氫之影響因子

### 2.8.1 溫度

溫度能夠影響微生物生長、代謝和酵素反應，在適當的溫度條件馴養之下能夠到最佳的生長條件，微生物的活性、繁殖速度及代謝產物也能夠得到最大量。

一般暗醱酵的溫度可以分為中溫（30~38°C）和高溫（50~55°C），但已有學者證明，在高溫的條件之下進行醱酵生物的反應速率和機質的消耗率都比中溫來的高。Zhang 等人比較了在中溫 37°C 和高溫 55°C 不同條件下產氫的結果（Zhang *et al.*, 2003），實驗結果表明，在高溫的條件之下培養，微生物菌群的生長及氫氣產量明顯都高於中溫培養，換言之，馴養在高溫的條件有助於微生物的生長及代謝。

### 2.8.2 pH

pH 是影響微生物成長的和醱酵產氫的重要因素，pH 能夠直接影響 hydrogenase 的活性及改變微生物代謝路徑，在低 pH 之下氫化酶會受到干擾使得活性下降，微生物的生長也會受到影響。

在自然環境中，pH 範圍包括了從 0.5~10 之間，一般微生物最佳的生長 pH 是在中性的 pH7，只有少數的極端細菌可以生活在極酸或是極鹼的環境之下。目前已有多篇文獻對於產氫醱酵微生物 pH 範圍的研究，最佳的醱酵產氫菌培養範圍在 pH5~7 之間（Kawagoshi *et al.*, 2005），當 pH 過低或是太高，微生物可能會受到影響因此停止生長。

### 2.8.3 鐵、鎳離子濃度

氫化酶（hydrogenase）是一種能夠催化氫氣形成的酵素，在微生物體內通過可逆反應催化氫氣氧化還原反應，反應如式 2-23。氫化酶可以根據

中心的金屬原子組成分為鎳鐵氧化酶 ([Ni Fe] hydrogenase)、鐵鐵氧化酶 ([Fe Fe] hydrogenase) 和單鐵氧化酶 ([Fe] hydrogenase) 三種，其結構如 Fig 2-8 所示。



鎳鐵氧化酶為分布最為廣泛的氫化酶，普遍存在細菌和古菌中，鐵鐵氧化酶則僅有少數的微生物擁有，其主要存在於厚壁菌門如 *Clostridium sp.*，是為主要作用於氫氣生成之酵素。Lin 等人評估了金屬離子  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  以及  $\text{Mg}^{2+}$  在產氫發酵上的影響，發現在發酵初期以及末期中都是  $\text{Fe}^{2+}$  影響最大 (Lin *et al.*, 2002)。

在醱酵的環境之下，若是缺乏鐵離子會降低氫化酶的活性，Lee 等人進行了評估不同濃度鐵離子在產氫醱酵的影響 (Lee *et al.*, 2001)，以添加  $\text{FeCl}_2$  的方式來補充鐵離子，實驗進行了在培養過程中不添加以及添加至濃度 4000 mg 的  $\text{FeCl}_2$ ，結果表明，產氫量以添加的濃度增加而遞增，最好的結果是在濃度 800 mg，得到了  $131.9 \text{ H}_2 \text{ ml/g}^{-1} \text{ sucrose}$  的產量。

在厭氧醱酵產氫的過程中若是有鎳離子的補充可以提升產氫效率，然而過高濃度的鎳離子會對微生物產生較強的毒性 (Lin *et al.*, 2002)。Wang 和 Wan 評估了不同鎳離子下對產氫的影響，研究指出當  $\text{Ni}^{2+}$  濃度在 0~0.1 mg/L 之間時，產氫量會隨著濃度增加而上升，在 0.1 mg/L 的時候可以得到最高的產氫量  $296.1 \text{ mL/g glucose}$ 。當鎳離子濃度高過 10 mg/L 時則會開始影響微生物的生長，所得之產氫量比起無添加鎳離子的實驗組來的還低 (Wang and Wan, 2008)。

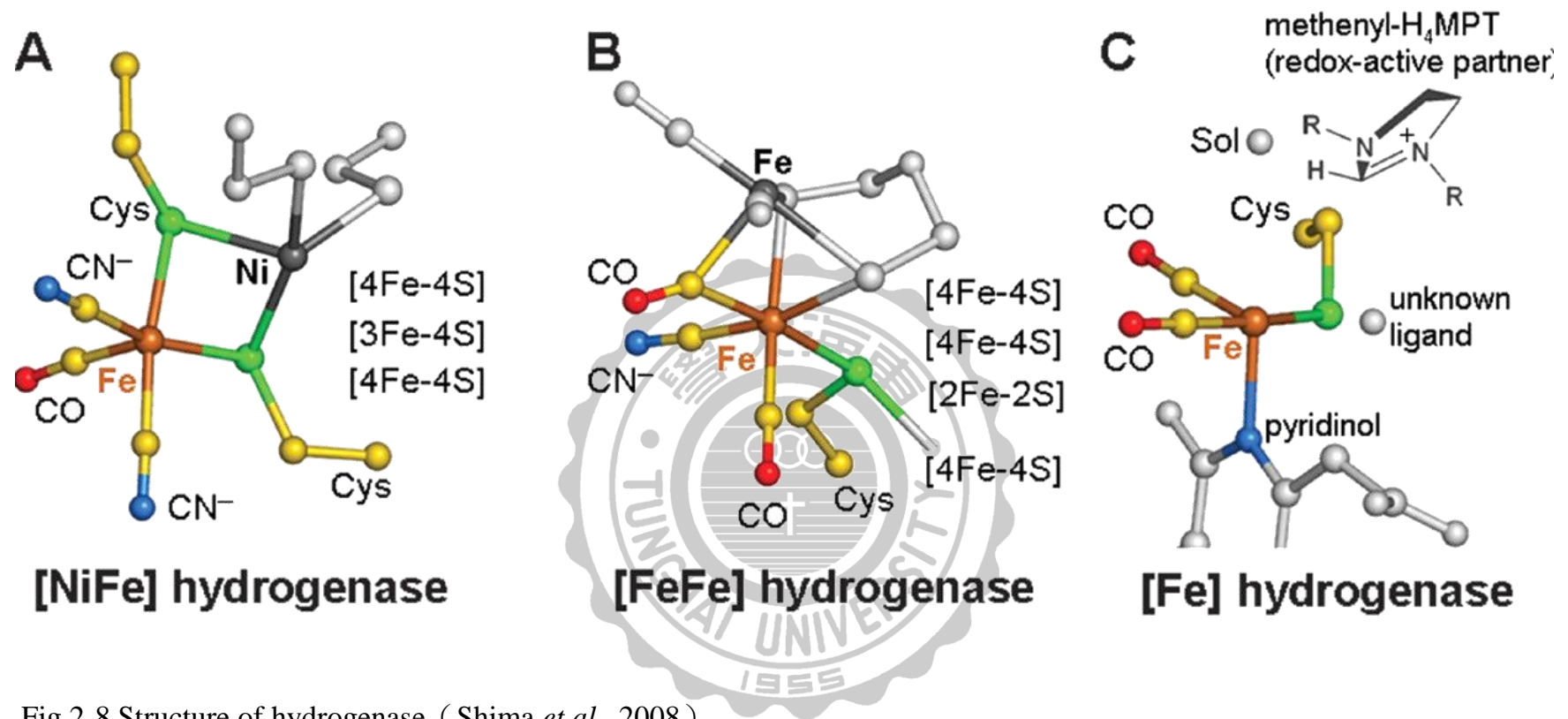


Fig 2-8 Structure of hydrogenase ( Shima *et al.*, 2008 ) .

## 2.9 甲烷菌抑制

在厭氧醱酵代謝過程中氫氣是做為副產物而存在，所以在自然的情況之下氫氣較難以累積，少量產出的氫氣也會被甲烷菌消耗產生甲烷和二氧化碳。傳統的生物產氫一般都是以熱處理的方式來抑制甲烷菌的活性，只留下能夠生產內孢子的產氫菌群 (Nissilä *et al.*, 2011)，但使用熱篩的方式同時也將某些不會生產內孢子的產氫菌如 *Enterobacter sp.* 也一併去除，而添加化學藥物抑制的方式可以在不影響其它微生物的活性之下對甲烷菌進行抑制 (Fig 2-9)，例如溴乙烷磺酸酯 (2-bromoethanesulfonata, BES)。

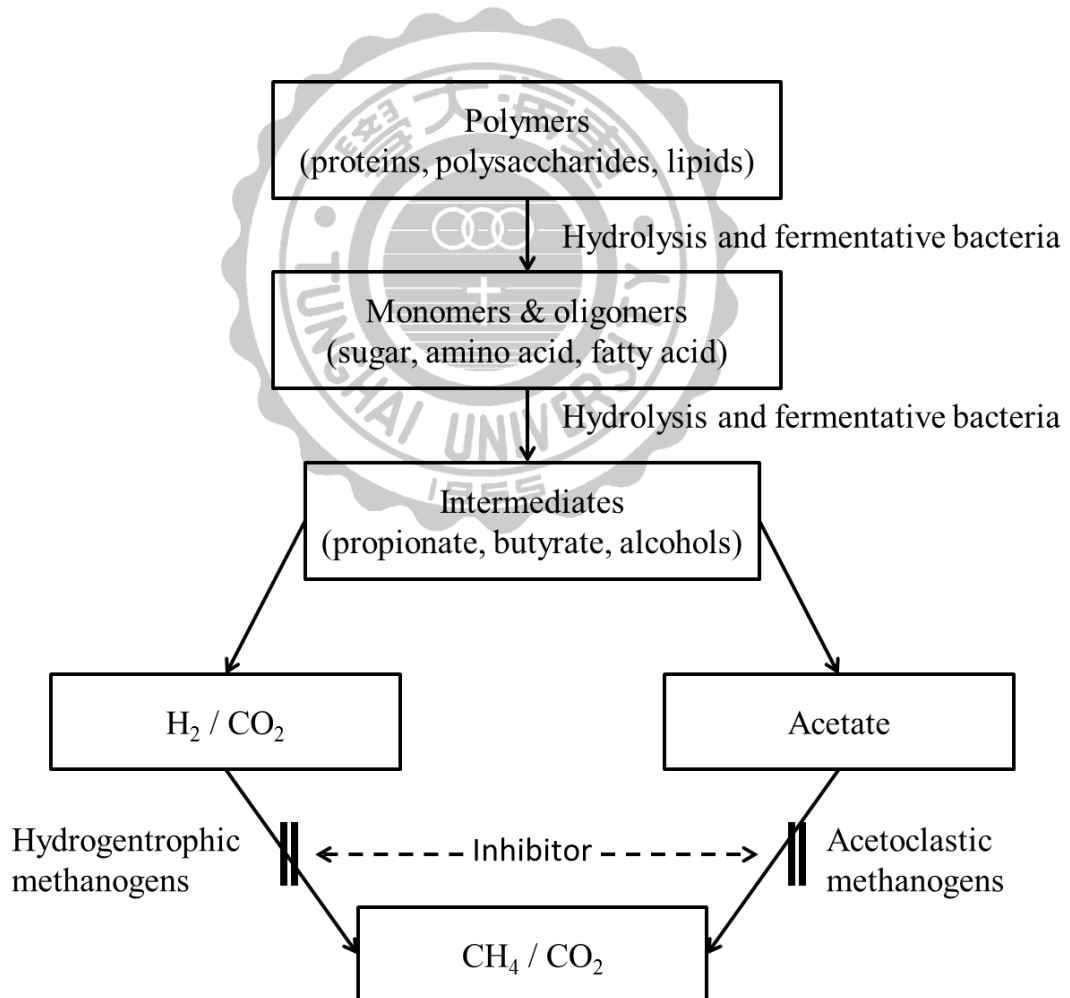


Fig 2-9 Schematic of inhibition by chemical inhibitors (Liu *et al.*, 2011) .

BES 是一種廣泛被應用在抑制甲烷菌上的化學抑制劑，它是一種構造類似甲基輔酶 M 的類似物 (Fig 2-10)，甲基輔酶 M 是甲烷菌特有的一種輔酶，它是在代謝途徑中甲基轉移反應所需要的一種輔酶，BES 可以藉由競爭來抑制甲基轉移反應中在最後利用氫氣及二氧化碳生成甲烷的步驟 (Chae *et al.*, 2010)。

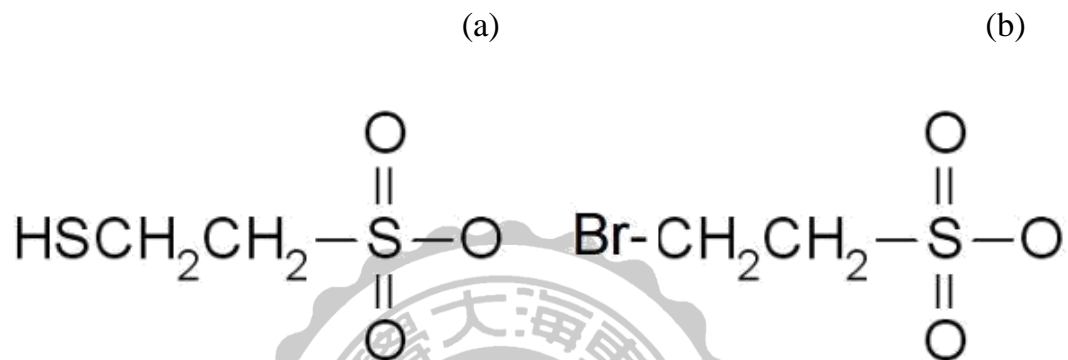


Fig 2-10 Structures of Coenzyme M (a) and BES (b). (Ettwig, 2006) .

Anderson 等人證實了使用硝基化合物 (Nitrocompounds) 可以有效減少甲烷的生成，在體外試驗中能減少 90% 之甲烷，而在體內試驗中能夠減少 43% 的甲烷。它是經由抑制甲酸和氫的氧化，降低甲烷菌使用基質的效率；硝基乙烷 (Nitroethane) 也被證實其做為末端電子接受者和甲烷菌做競爭 (Anderson *et al.*, 2000)。另外在此篇報導提到硝基化合物可以有效抑制 formate dehydrogenase 及 formate hydrogen lyase 的活性，藉此來抑制甲烷的產生 (Anderson *et al.*, 2008)。

Zhou 等學者進行了使用 7 種不同化學藥劑：2-bromoethanesulfonata, (BES)、propynoic acid (PA)、nitroethane (NE)、ethyl trans-2-butenoate, (ETB)、2-nitroethanol (2NEOH)、sodium nitrate (SN) 和 ethy-2-butynote (PA) 等抑制劑進行甲烷菌抑制的研究 (Zhou *et al.*, 2011)。在這幾種抑

制劑中除了 ETB 之外，其於都有抑制甲烷菌的效果，2NEOH 能夠抑制 99.3% 的甲烷生成、其次 PA 能夠抑制 75.7% 以及 SN 能夠抑制 70.1% 的甲烷；Chae 等人使用 BES 及 Lumazine 評估抑制效果並應用在燃料電池產氫醱酵上的研究 (Chae *et al.*, 2010)，文獻指出 BES 能夠有效的抑制甲烷菌的活性，且與無抑制的相比，能夠產出約 1.4 倍的氫氣量，並且在 10 個繼代培養結束後仍然能夠完全抑制甲烷菌，而 Lumazine 則幾乎沒有抑制甲烷的效果。Gonçalves 等人使用了 BES 抑制甲烷菌並且以橄欖油廢水產氫醱酵的研究 (Gonçalves *et al.*, 2014)，從結果得出使用 BES 能有效降低甲烷量生成，在研究過程中僅有少量甲烷的累積，氫氣的累積產量可達到 50 g COD/L；Anderson 等人探討了 2-nitro-1-propanol (2NPOH)、3-nitro-1-propionic acid (3NPA)、nitroethane (NE) 及 2-nitroethanol (2NEOH) 等四種硝基化合物抑制甲烷的影響及作用 (Anderson *et al.*, 2008)，在不額外添加還原劑的狀況下，2NEOH、NE 以及 3NPA 都能抑制 > 97% 的甲烷，而 2NPOH 較少只有 41%。

## 2.10 茶葉

在台灣冷飲店平均每日能生產出約 10430 噸的廢茶葉，一般店家單純的只是將廢茶葉做廢棄處理，含水量高的茶葉在運送上不但會增加成本，對於焚化處理也會降低焚化爐整體熱值，影響焚化爐的效率。茶葉的纖維素含量豐富，由於是葉片部位所以木質素所佔比例也較低，而且有著單一性，不像一般農林廢棄物、廚餘等混雜多種物質，在醱酵時對基質的控制也較容易。但是在茶葉中含有茶多酚，而目前為止已有多篇文獻證實茶多酚會影響微生物的生長，所以應用於產氫醱酵上還需要更進一步評估優化。

### 2.10.1 茶多酚

茶多酚 (Tea Polyphenols) 又稱茶單寧、茶鞣質，是在茶葉中多酚類物質的總稱，這些多酚類物質包括了黃烷醇類、花色苷類、黃酮類、黃酮醇類和酚酸類等，在這些酚類物質中黃烷醇類也就是兒茶素所佔比例最高，大約為 70%。

茶多酚的應用非常廣泛，它是一種很強的抗氧化劑，添加在食品內可以有效的防止食品、食用油品的腐敗，同時還可以消除異味，在醫學上還有應用在抗菌、治療/預防癌症以及治療心血管疾病等多種應用 (Tao and Lambert, 2014; Liang *et al.*, 2014)。Hara-Kudo 等人進行了評估茶多酚對三種會產孢子的病原菌 *Clostridium botulinum*、*Clostridium butyricum* 及 *Bacillus cereus* 的抗菌作用 (Hara-Kudo *et al.*, 2005)，將孢子暴露在含有不同濃度的茶多酚裡進行培養，可以明顯看出菌落數會隨著茶多酚增加而減少，在濃度 1000  $\mu\text{L}/\text{mL}$  的培養條件下 *Clostridium botulinum* 和 *Clostridium butyricum* 在培養數周均可以完全的抑制微生物生長，*Bacillus cereus* 則只有略為下降，這個結果表明了茶多酚確實會對微生物的生長造成抑制，但不同的微生物之間所造成的影響也會有所不同。

### 2.11 反應曲面法

對於含有複數以上因子之最適化反應，在傳統上還是以一組實驗決定一個實驗變因，沒有考慮到因子與因子之間的交互關聯效應，反應曲面法是以較少的實驗次數，並以數學上統計的方法得到因子與反應值及因子與因子之間互相影響的結果，以獲得最精準的模型。由於反應曲面有著可以同時測定數種因子之間相互的影響的優勢，目前廣泛的被應用在各個領域上，能夠有效的提供製程改善、解決高相關因子之關聯和各項變數條件最佳化。

### 2.11.1 反應曲面原理

反應曲面法最早是由 BOX 和 Wilson 兩人所提出，以實際實驗數據結合數學統計來求出因子與目標函數之間的關聯，發展至今模式建立可以歸納為下列步驟:首先要先找出極值點之區域，先決定出關鍵因子，並決定其有效範圍，再利用二水準因子設計 (Two level factorial design) 及陡升路徑法 (Method of path of steepest ascent) 尋找出極值點的區域，接著利用中心中心混層設計法 (Central composite design) 結合實驗後的數據，並已多元回歸 (Multiple regression) 分析二階模式的數據契合度，再以統計的方式來驗證此模式的適切性，待確定模式後，以求極值點之數學理論決定極值點之位置及計算理論值的最適值，最後再藉由數學模式分析因子間的相互關聯性，以實驗數據證實統計出的極值點 (Fig 2-11)。





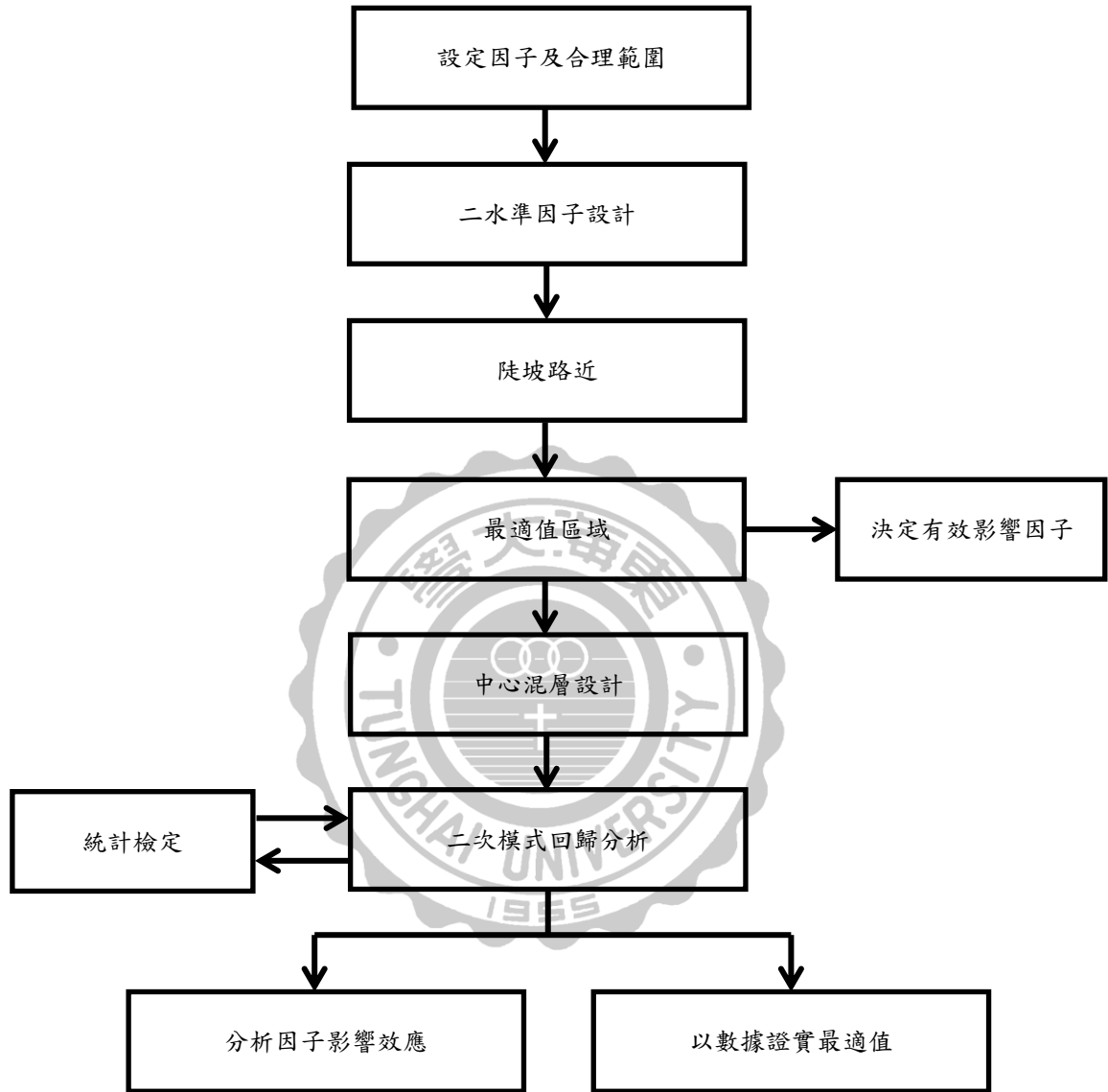


Fig 2-11 Process flowchart of response surface (葉，2011) .

### 2.11.2 二水準因子設計

二水準因子也就是在有  $n$  個因子的變因下，需進行  $2^N$  組實驗，而因子可以設定為兩個水準：高水準和低水準（Table 2-3），其水準範圍需要依照實驗有效範圍來進行設定。

Table 2-3 The design table of  $2^3$  factors (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	$Y_8$

\* $X_1$ - $X_3$ : factors;  $Y_i$ : response

### 2.11.3 陡升路徑法

陡升路徑法是以實驗之中心因子為起點，並且沿著最陡之上升方向朝著最大反應變數逐次增加，在每個實驗點比較與前次實驗值，若該次的數值高於前次之數值，表示此模式仍然向著極值點之方向前進，直到反應值不再持續增加為止（Fig 2-12）。

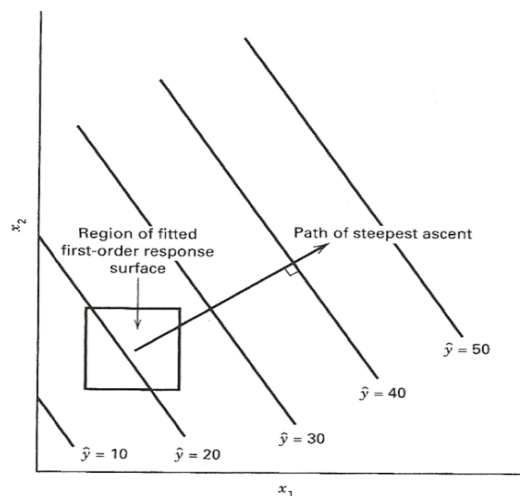


Fig 2-12 Response surface of two variance system (Montoro *et al.*, 2013).

#### 2.11.4 中心混成實驗

使用二水準因子及陡升實驗初步找出極值點的範圍，再透過二階模式（式 2-20）確定極值點之位置\

$$Y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^4 \beta_{ki}X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii}X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{kij}X_iX_j \quad (\text{式 2-20})$$

中心混成實驗以原點為基礎向外延伸，並在設計點與原點之間的距離間設下實驗點，而中心點實驗則是重複進行原點的實驗來估計實驗中的誤差值，一般重複實驗次數約在 3-6 個之間 (Fig 2-13)。依照中心混成實驗設計進行實驗後，再將所得數據以多元回歸分析二階模式實驗數據的契合度。

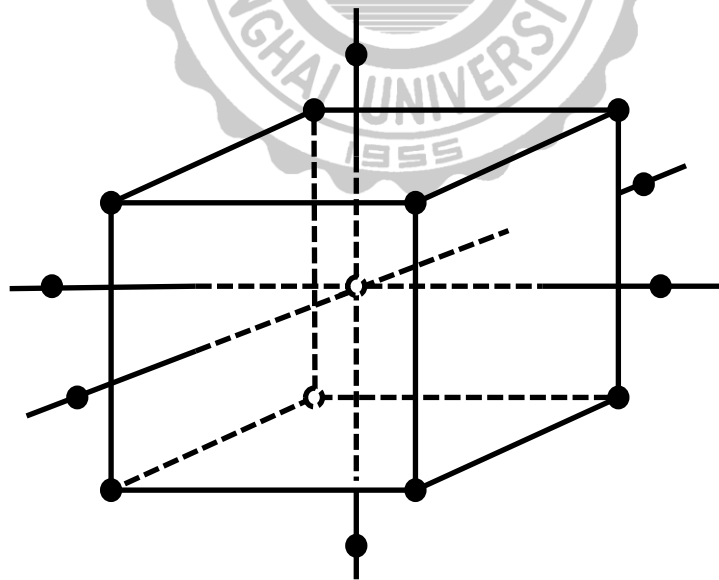


Fig 2-13 Schematic diagram for central composite design.

### 第三章 材料與方法

#### 3.1 實驗流程設計

本研究是利用荷仕登乳牛之瘤胃（Rumen）腸道菌，使用化學藥劑之方式篩選分離出纖維素水解產氫菌，並且以廢棄茶葉渣做為基質進行多種測試。實驗流程圖如 Fig 3-1 所示。

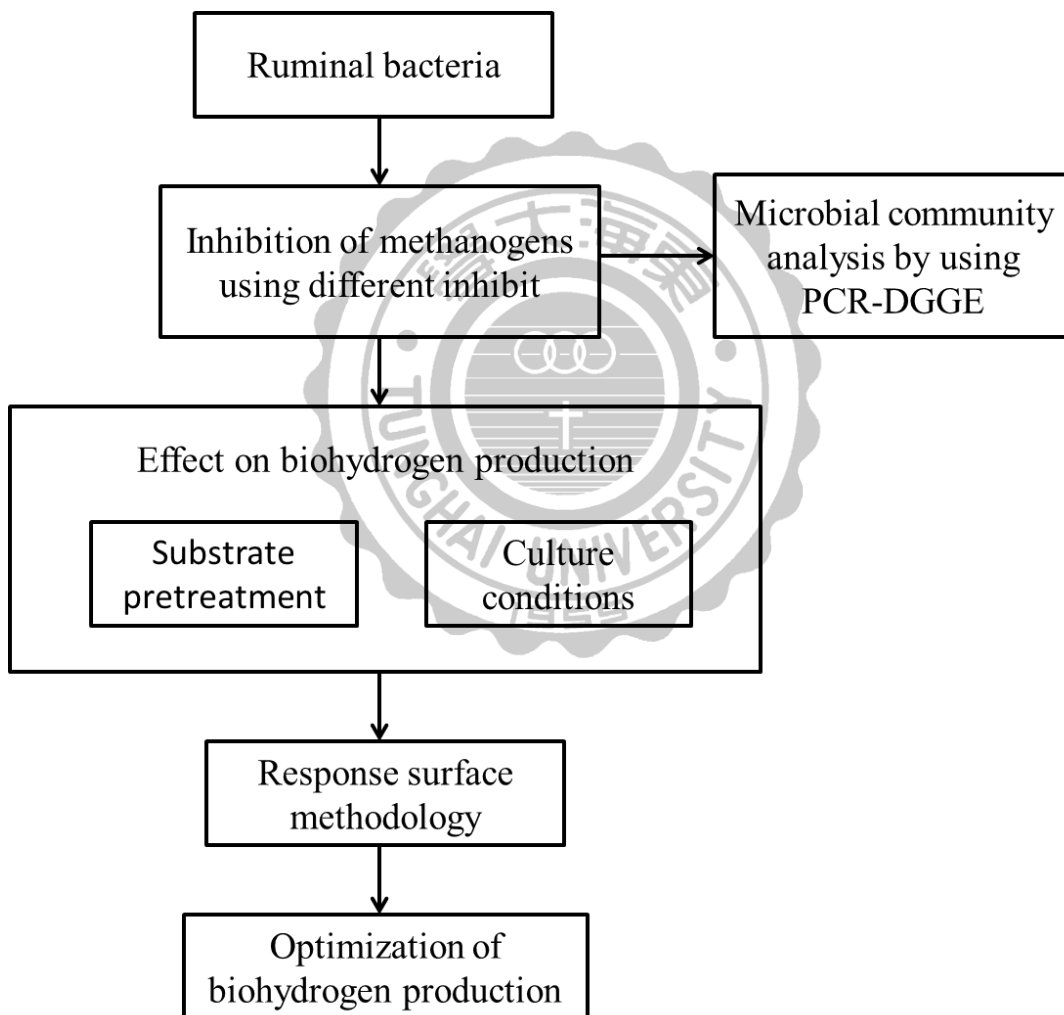


Fig 3-1 Schematic flowchart of experimental design.

### 3.2 菌株來源

本研究使用的菌種來源為東海牧場所養殖的荷仕登乳牛之瘤胃液。採樣時先將瘤胃管 (Rumen tube) (Fig 3-2) 伸入乳牛之喉管內，到達瘤胃後將胃液直接用瘤胃管吸出，取出的胃液保存於滅菌過的 50 mL 離心管，並且帶回實驗室植種。植種時將瘤胃液培養於 55°C 高溫厭氧的環境之下並且以廢紙為基質，培養出嗜熱降解纖維素的微生物族群。在數個繼代培養之後，瘤胃液微生物可以在七天之內將 5 g/L 的廢紙降解完全並產生氫氣、甲烷等氣體。該菌群再以添加二硝基乙醇 (2-nitroethanol) 的方式去除甲烷菌，篩選出菌群中的水解、產氫菌群。

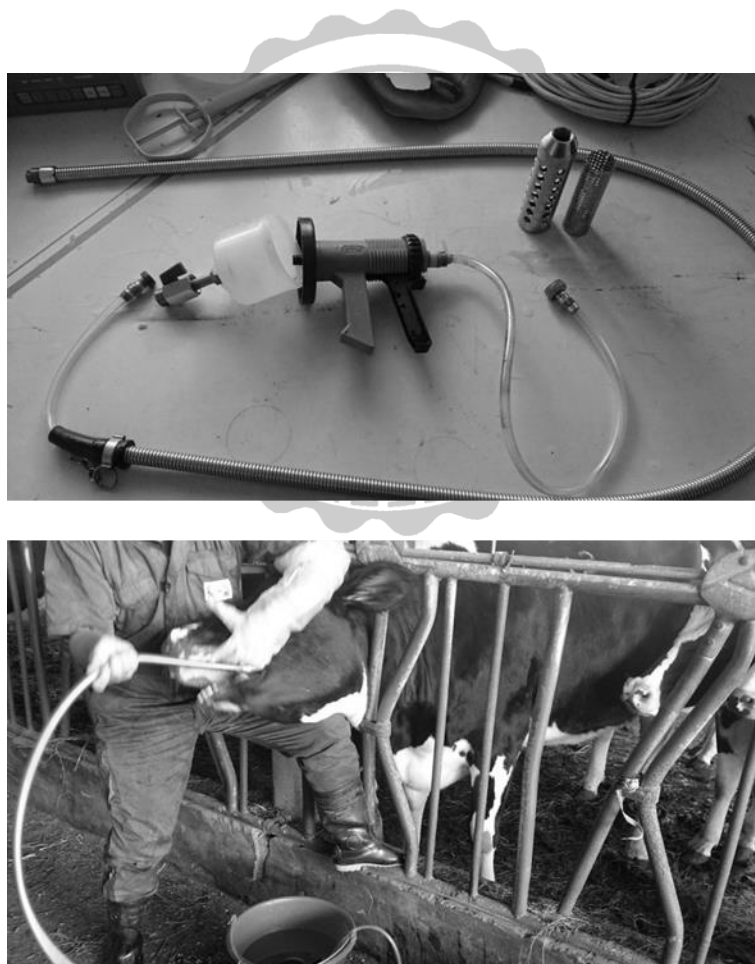
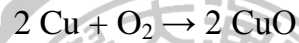


Fig 3-2 Schematic diagram of rumen tube and collection from dairy cattle.

### 3.3 菌種培養

#### 3.3.1 厭氧操作

本研究是利用 Hungate 厭氧操作技術以培養在絕對厭氧條件下生存之微生物 (Hungate, 1969)，其操作設施厭氧加氣站如圖 Fig 3-3 所示。厭氧加氣站主要構造為三種氣體鋼瓶—氫氣、氮氣及混合氣，以及銅絲加熱包，構造皆由氣密性高的銅管及軟管串連。在使用加氣站之前，必須先將加熱包的溫度升至 250~300°C 後通入氫氣，氫氣與 CuO 反應後會將銅絲還原使其呈現成粉紅色，還原後的銅絲可以捕捉設備中微量的氧氣，讓設備到達絕對厭氧的條件，其反應公式如下 (式 3-1)：



(式 3-1)

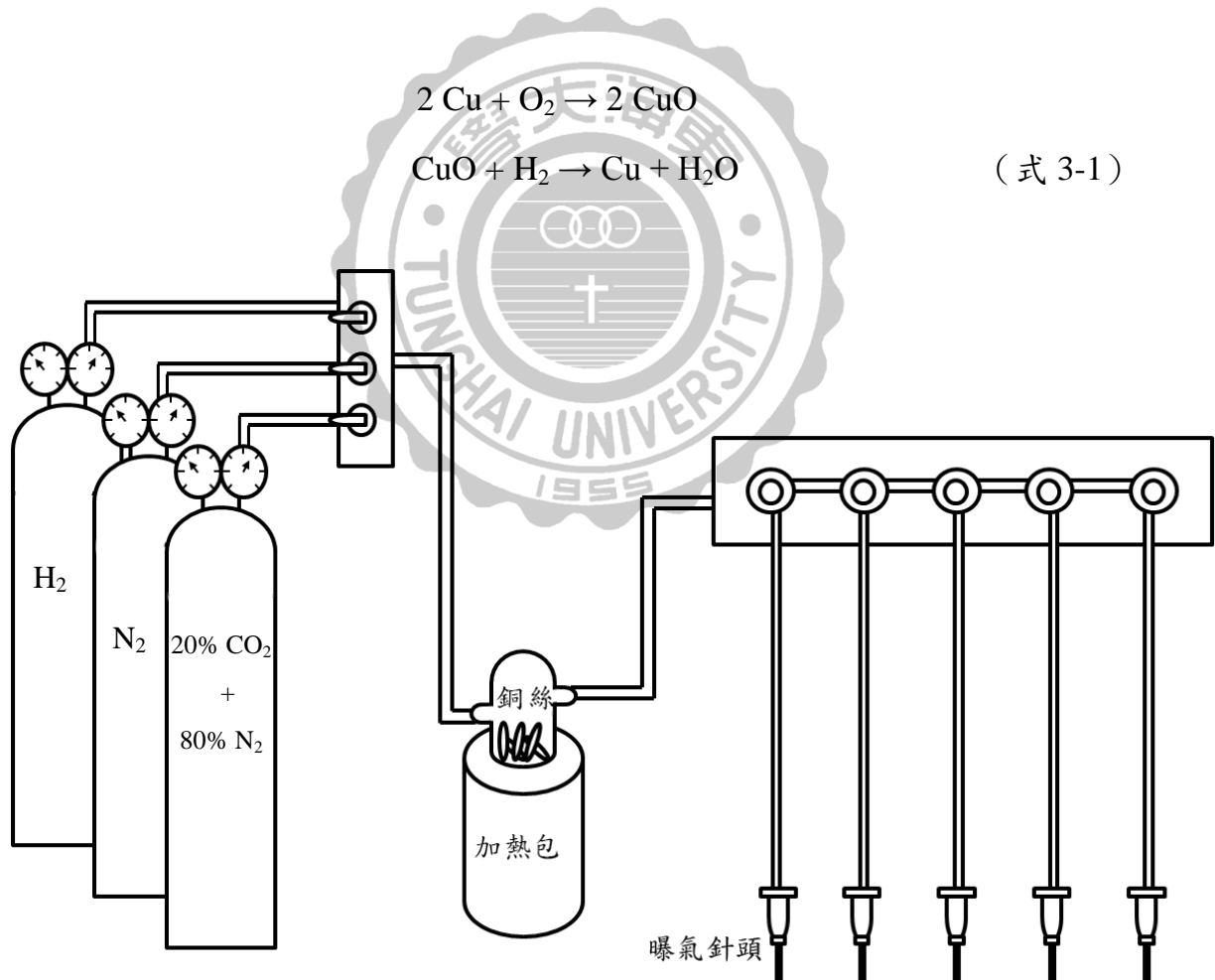


Fig 3-3 Schematic diagram of Hungate gas station.

### 3.3.2 嗜熱厭氧培養基

在進行微生物的培養使用嗜熱性厭氧培養基(Thermophilic anaerobic medium; TA medium)，成分如 Table 3-1 所示，配置時需將培養基使用氮氣吹拂，將無機鹽類、Resazurin 氧氣指示劑微量元素 Trace element solution (Table 3-2) 等依序加入後將培養基煮沸。培養基煮沸後關掉火源待培養基冷卻至 60°C，將原本的氮氣換成混合氣 (20% CO<sub>2</sub> + 80% N<sub>2</sub>) 加入培養基還原劑 L-Cysteine hydrochloride，及調整 pH 的 NaHCO<sub>3</sub>，等到培養基從粉色轉變為透明無色即可分裝至厭氧血清瓶中，分裝完後的厭氧血清瓶再使用橡膠塞以及鋁蓋密封，維持瓶內的厭氧狀態，再以高溫高壓滅菌釜進行滅菌 (121°C、1.2 kg/cm<sup>3</sup>)。在植種時須先加入 Na<sub>2</sub>S 當作還原劑，以確保培養基中是絕對無氧的狀態，再依序加入 Vitamin solution 10 ml (Table 3-3) 及 Yeast extract 1 g/L，植菌量為最終體積的 10%。基質濃度為 5 g/L 廢紙，培養於 55°C 之培養箱內並以 150 rpm 搖晃。

Table 3-1 Basal composition of thermophilic anaerobic medium

Component	Concentration (L <sup>-1</sup> )
CaCl <sub>2</sub>	0.05 g
MgCl <sub>2</sub>	0.1 g
(NH <sub>4</sub> )Cl	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4 g
Resazurin	0.5 mg
Trace element solution	1 mL
L-Cysteine hydrochloride	0.5 g
NaHCO <sub>3</sub>	4 g

Table 3-2 Composition of trace element solution

Component	Concentration (L <sup>-1</sup> )
CoCl <sub>2</sub>	0.05 g
CuCl <sub>2</sub>	0.03 g
FeCl <sub>2</sub>	2 g
MnCl <sub>2</sub>	0.05 g
NiCl <sub>2</sub>	0.05 g
ZnCl <sub>2</sub>	0.05 g
AlCl <sub>3</sub>	0.05 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.05 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0.05 g

\*配置儲備溶液前須先以少量水稀釋 1 mL 37% HCl，再加入 0.5 g Na<sub>2</sub>EDTA，待 Na<sub>2</sub>EDTA 完全溶解後再加入其他微量金屬。

Table 3-3 Composition of vitamin solution

Component	Concentration (L <sup>-1</sup> )
Biotin	2 mg
Riboflavin	5 mg
Vitamin B12	0.1 mg
DL-Ca-pantothenate	5 mg
Pyridoxine-HCl	10 mg
Thiamine-HCl	5 mg
Folic acid	2 mg
Lipoic acid	5 mg
Nicotinic acid	5 mg
P-aminobenzoic acid	5 mg



### 3.3.3 甲烷生成抑制

本研究參考了 Zuou 等人之研究 (Zuou *et al.*, 2011)，使用了三種不同之硝基化合物 (Nitrocompounds) 與熱處理 (Heat treatment) 來將瘤胃腸道菌中的水解產氫菌分離。根據 Anderson 學者等研究，硝基化合物可以有效的抑制甲烷菌中甲酸脫氫酶 (Formate dehydrogenase) 及解甲酸裂解酶 (Formate hydro lyase activity) 的活性，藉此來達到抑制甲烷菌生長的目的 (Anderson *et al.*, 2008)。

在產氫菌分離的試驗中，使用基質 5 g/L 廢紙的 TA 厭氧培養基，分別加入三種不同硝基化合物抑制劑：二硝基乙醇 (2-nitroethanol, 2NEOH)、2-溴乙基磺酸鈉 (2-bromoethanesulfonate, BES) 及硝酸鈉 (Sodium nitrate, SN)，每瓶培養基添加之抑制劑為最終濃度 1.2 mM，添加完後將瘤胃菌液以 10% 的比例植入培養基內，置於 55°C 培養箱、150 rpm 的條件下觀察其產氣狀況。在熱處理的部分，將瘤胃菌液直接植入培養基後進行高溫高壓滅菌，藉由高溫的方式保留下具產氫能力的微生物，處理過後的培養基再加入碳源及營養成分後置入 55°C 培養箱 150 rpm 觀察生長、產氣情形。

### 3.3.4 基質來源

本研究之廢棄茶葉渣基質來自清心福全飲料店豐勢分店，其廢茶葉渣內含有烏龍茶葉、高山茶葉、普洱茶葉及紅茶葉，多種茶葉混合而成。收集來的茶葉渣先經過烘箱 105°C、24 hr 完全乾燥，將茶葉渣使用一般家用果汁機破碎後將其過篩至 1 mm 孔徑大小篩網，確保基質的均質化以供後續之使用。

### 3.3.5 基質前處理

纖維素是由單糖組成的長鏈聚合物，但由於它的鏈狀結構使得生物較

難以直接利用，需先經過水解的步驟，將鏈狀結構打破分解成單醣或雙醣這類微生物較好利用的型態後才能以這些醣類進行醱酵。本次前處理實驗中參考了Liu等人和Chen等人之研究(Liu *et al.*, 2011);(Chen *et al.*, 2011)，利用微波消化、加熱酸處理以及熱處理三種方法，比較纖維素破壞情形，並將處理過後的基質進行產氫醱酵。

在微波消化的實驗，將 5 ml 0.2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 1 g 基質加入消化管(HP-500 Plus)內，使用在微波消化器(MARS 5, CEM, USA)在微波功率 150 W 下測試不同消化時間(5、6、7 及 8 分鐘)下的處理效果。消化完後將消化管置於抽氣櫃中冷卻 30 分鐘，冷卻完後將樣品以抽氣過濾的方式分離固體與液體，再以 500 mL 之純水清洗消化後的固體樣本，洗去殘留在基質上的硫酸，最後將基質放入 105°C 烘箱 24 hr 乾燥。

加熱酸處理的實驗中，先將 5 ml 0.2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 煮至沸騰，再將 1 g 基質加入煮沸的硫酸溶液中，測試在不同加熱時間(5、15、30、45 和 60 分鐘)下的處理效果。反應結束後將樣品置於抽氣櫃中冷卻 30 分鐘，再以抽氣過濾的方式分離固體與液體，以 500 mL 之純水清洗固體樣本，最後將基質放入 105°C 烘箱 24 hr 乾燥。

在熱處理的部分，將 50 mL 的純水煮至沸騰(100°C)，並加入 1 g 的基質，測試在不同處理時間(0、10 和 30 分鐘)下的處理效果，後續處理方式如上述兩組實驗。

### 3.4 環境影響因子

#### 3.4.1 溫度

溫度對於微生物的生長、活性來說是一個很重要的影響因素，在最適的溫度之下可以有效的增加微生物的生長以及纖維素水解產氫的速率。本實驗以 5 g/L 的廢茶葉渣為基質，培養溫度由先前培養溫度 55°C 上下做調

整，分別為 50°C、55°C、60°C 及 65°C，並且分別測量每日 pH 變化、微生物生長、液相及氣相代謝產物之變化。

### 3.4.2 基質濃度

作為培養基中的唯一碳源，基質濃度的多寡直接影響了微生物的生長以及代謝產物。本實驗以廢茶葉作為微生物生長基質，並測試在 5 g/L ~ 20 g/L 之濃度下微生物的生長及產氫能力之情形。

### 3.4.3 pH

pH 是醱酵產氫中一個重要的因素，在不同的 pH 培養條件下會影響其微生物產物的代謝途徑、微生物生長活性和氫化酶的活性，已經有文獻證明，在適當的 pH 範圍內可以有效的提高產氫菌的產氫能力 (Wang *et al.*, 2009)。在本次實驗裡，藉由調整培養基中  $\text{NaHCO}_3$  的濃度來調整培養基的初始 pH 質 (Table 3-4)。實驗中探討了 pH 5 ~ 8 範圍中微生物生長及氣相、液相等代謝產物的變化。

Table 3-4 Relationship of initial pH and  $\text{NaHCO}_3$  concentration

Concentration of $\text{NaHCO}_3$ (g/L)	0.4	1.26	12.6	54.4
Initial pH	5.3	6.48	7.5	8

### 3.4.4 亞鐵離子

氫化酶能夠催化氫氣的氧化還原，一般又根據氫化酶中心的金屬原子區分為 [Ni-Fe]hydrogenase、[Fe]hydrogenase 和 [Fe-Fe]hydrogenase 這三種，鐵可以藉由影響氫化酶的活性來影響產氫醱酵，所以鐵是產氫菌在醱酵中

不可或缺的一個重要金屬元素。本實驗探討了不同濃度亞鐵離子 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 的培養條件下的影響，在配置培養基時使用不含  $\text{FeCl}_2$  之 Trace element solution，並另外準備  $\text{FeCl}_2$  之儲備溶液添加至培養基內，使最終濃度為 0、2 及 200 mg/L。

### 3.5 分析方法

#### 3.5.1 纖維素分析

為了瞭解茶葉渣之纖維素、半纖維素及木質素的組成比例，本研究使用了 Van Soest 學者測量纖維素之方法 (Van Soest *et al.*, 1991)。中洗纖維 (Neutral detergent fiber, NDF) 是由半纖維素、纖維素、木質素及一些蛋白質等的物質所組成；酸洗纖維 (Acid detergent fiber, ADF) 是由纖維素和木質素所組成，藉由不同組成的產物相減後即可求得纖維素組成比例，實驗步驟如下：

中洗纖維：將 1 g 的樣品添加至 100 mL 之中洗溶液 (Table 3-5) 加熱沸騰 60 分鐘，接著以坩堝型過濾器 (pore size 40~50 $\mu\text{m}$ , IWAKI) 進行抽氣過濾，將固體樣本與液體分離，再使用 40 mL 的熱水清洗殘渣後過濾，此步驟重複進行一次，使用 40 mL 丙酮 (Acetone) 清洗、過濾殘渣，此步驟同樣重複進行一次，最後將坩堝型過濾器放入 105 $^{\circ}\text{C}$  烘箱烘乾殘渣，紀錄殘渣重量。

酸洗纖維：將 1 g 的樣品添加至 100 mL 之酸洗溶液 (Table 3-6) 之中加熱沸騰 60 分鐘，以坩堝型過濾器 (pore size 40~50 $\mu\text{m}$ , IWAKI) 進行抽氣過濾，用 40 mL 的熱水清洗殘渣後過濾，此步驟重複進行一次，再使用 40 mL 丙酮 (Acetone) 清洗殘渣後過濾，此步驟同樣重複進行一次，最後將坩堝型過濾器放入 105 $^{\circ}\text{C}$  烘箱烘乾殘渣，紀錄殘渣重量。

酸洗木質素 (Acid detergent lignin; ADL)：將烘乾的酸洗纖維素殘渣加

入  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (72%) 25 mL 以玻棒攪拌至糊狀，每小時加入 2 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (72%) 並且攪動均勻。3 小時後將產物以坩堝型過濾器進行抽氣過濾，用熱水將殘渣清洗乾淨，置入 105°C 烘箱烘乾稱重，再將殘渣放入 500°C 高溫爐中進行灰化，完成後同樣稱重。

取得中洗纖維、酸洗纖維、酸洗木質素和酸洗木質素灰化後乾重後即可求得纖維素、半纖維素及木質素重量：

$$\text{Hemicellulose} = \text{NDF} - \text{ADF}$$

$$\text{Cellulose} = \text{ADF} - \text{ADL}$$

$$\text{Lignin} = \text{ADL} - \text{ADF ash}$$

Table 3-5 Component of neutral detergent (ND) solution

Component	Concentration ( $\text{L}^{-1}$ )
Sodium lauryl sulfate	30 g
EDTA	18.61 g
Sodium tetraborate decahydrate	6.81 g
Sodium phosphate dibasic	4.56 g
Tri-ethylene glycol	10 ml

Table 3-6 Component of acid detergent (AD) solution

Component	Concentration ( $\text{L}^{-1}$ )
Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)	20 g
$\text{H}_2\text{SO}_4$	28 ml

### 3.5.2 茶葉 COD 分析

本實驗參照中華民國行政院環境保護署環境檢驗所公告之水中化學需氧量檢測方法—密閉式重鉻酸鉀迴流法 (NIEA W517.52B) 來進行。由於測量物質為固體物，在分析前先利用果汁機將固體物打碎，再使用純水依照進行適當的稀釋，方可進行測量。

### 3.5.3 茶多酚濃度分析

茶多酚 (Tea polyphenols) 濃度的分析使用酒石酸亞鐵分光光度計比色法 (Liang *et al.*, 2003)。測定原理為茶多酚能與亞鐵離子反應形成紫藍色錯合物，其溶液再以分光光度計進行測定。實驗步驟如下：

將 1 mL 的樣品加入 5 mL 染色溶液 (1 g 硫酸亞鐵和 5 g 酒石酸鉀鈉溶於 1000 mL 去離子水) 中反應，再添加 4 mL 的水與 15 mL 的磷酸鉀緩衝溶液 (0.067 M, pH 7.5)，靜置 5 分鐘等待呈色完成，並使用分光光度計在波長 540 nm 下測量吸光值，再以式 3-2 算出其茶多酚濃度。

$$TP \text{ (mg/g)} = 2A \times 1.957 \times (L1/L2 \times M) \quad (\text{式 3-2})$$

$L1$  = 總樣品體積 (mL)

$L2$  = 分析樣品體積 (mL)

$M$  = 茶葉重 (mg)

$A$  = 吸光值

1.957 = 常數

### 3.5.4 蛋白質濃度分析

本實驗所使用的基質為不可溶解之固體物，所以無法藉由測量  $OD_{600}$  來得知細胞生長。由於細胞構成的主要成分為蛋白質，所以可藉由測定蛋白質濃度來代表細胞的生長。本實驗使用市售蛋白質分析套件 (Bio-Rad Protein Assay) 以及 Bradford 測定蛋白質的方法來進行分析 (Bradford, 1976)，並以牛血清蛋白做為蛋白質標準品來配置檢量線 (附錄一)，實驗步驟如下：

抽取 1 mL 的培養液離心 (10000 rpm  $\times$  10 min) 去掉上清液，加入 1 mL Tris buffer (pH 7.6) 讓細胞重新懸浮後再次離心 (10000 rpm  $\times$  10min)，離心後去掉上清液，此步驟重複一次。加入 0.9 mL Tris buffer 及 0.1 mL 1N NaOH，將細胞重新懸浮後置入 100°C 的熱水 15 分鐘，離心後將上清液依照所需濃度進行稀釋，並和試劑以 4:1 的比例充分混和後靜置 5 分鐘，等待反應完成，使用分光光度計 (Spectrophotometer; SHIMADZU, UV mini-1240, Tokyo, Japan) 在波長 595 nm 之下測量吸光值。

### 3.5.5 還原糖濃度分析

還原糖濃度分析是參考了 DNS 法 (Miller, 1959) 並經由學者修改，其原理為 DNS 試劑中的 3,5-二硝基水楊酸能與還原糖產生氧化還原反應，生成 3-氨基-5-硝基-水楊酸，該物質會引起呈色反應，藉由呈色程度來判斷還原糖的多寡。由於纖維素水解後的主要產物為葡萄糖，因此製作檢量線時以葡萄糖為標準品 (附錄二)，實驗步驟如下：

從培養液中採取 1 mL 樣本離心 (10000 rpm  $\times$  10 min)，取 0.5 mL 的上清液與 0.5 mL DNS 試劑等體積的進行混合，混合完畢後置於 100°C 水浴 10 分鐘，水浴完後將樣本放入冷水中快速的冷卻至室溫，再利用分光光度計測量波長 540 nm 下的吸光值。

### 3.5.6 氣相產物分析

本實驗之氣體測量是利用排水集氣法在固定的時間收集血清瓶內所產生的 Biogas，其構造如 Fig 3-4，再以氣相層析儀 (SHIMADZU GC-14B Gas Chromatograph, Tokyo, Japan) 配合 Thermal conductivity detector (TCD) 分析其產出的氫氣濃度，使用之管柱為 Porapak T 80/100，注入之樣品體積為 0.4 mL。儀器分析條件之溫度分別為：oven 50°C、inject 120°C、detector 140°C，使用之載流器為氮氣，流速為 25 mL/min

氫氣檢量線 (附錄三) 配製步驟如下，先使用氮氣將密閉之血清瓶內的氣體置換，再以針筒打入不同百分比之氫氣，之後將氣瓶洩壓直至沒有氣體排出為止。

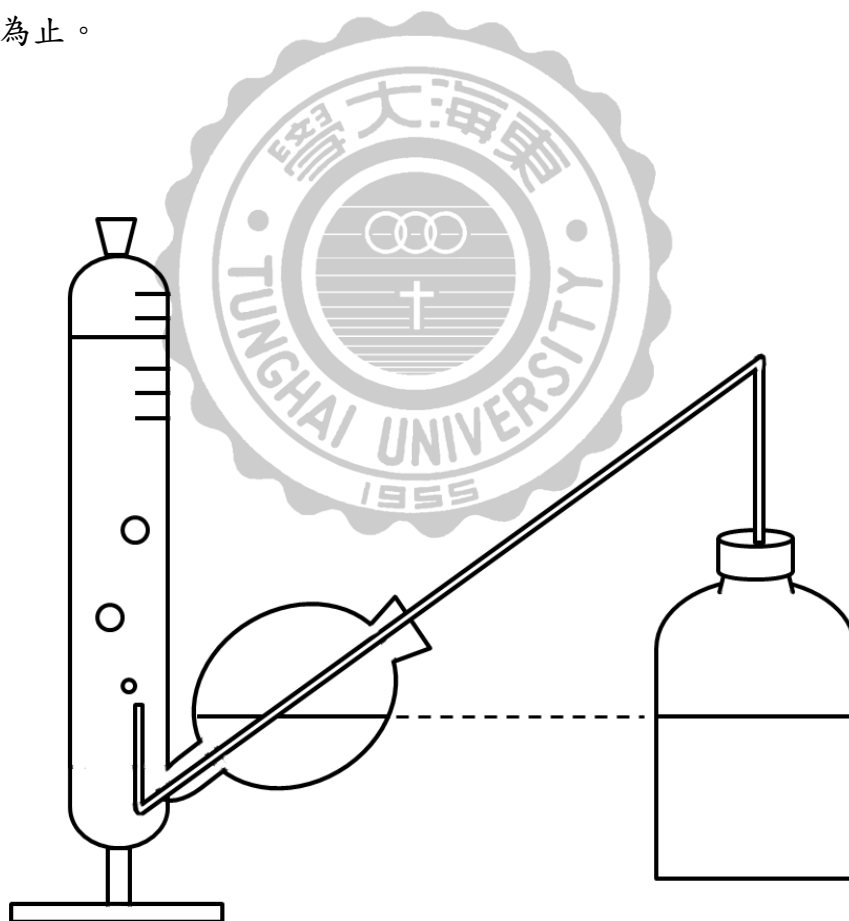


Fig 3-4 Schematic diagram of determines biogas volume.



### 3.5.7 液相產物分析

為了瞭解在培養微生物過程中所產生的揮發性脂肪酸、醇類及糖類濃度，使用高效能液相層析儀(High performance liquid chromatography; HPLC)來分析液相中的代謝產物，並根據纖維素水解產氫可能會產生出的代謝物來配置檢量線。本研究液相層析儀使用之偵測器為 Refractive index detector (SHIMADZU RD-10A, Tokyo, Japan)，分析管柱為 Transgenomic COREGEL 87H3 (300mm × 7.8mm)，移動相為 0.008 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液，流速 0.6 mL/min，樣品注射體積為 20 μl。樣品進行分析之前必須先經過離心 (10000 rpm × 10 min) 去除掉固體物，再將上清液通過孔徑 0.22μm 之針頭過濾器後才可進行 HPLC 分析。

### 3.5.8 產氫模式分析

實驗過程中的產氫能力由 Gompertz equation 回歸經過修改，將原本套用在人口成長模式上的公式套用於微生物生長模式上。微生物在生長的時候會先有一段遲滯期 ( $\lambda$ )，然後進入對數生長期，也就是最大反應速率 ( $R_{max}$ )，之後再進入穩定期 (Lay *et al.*, 2013)。

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

$H$  = 累積產氫量 (mL)

$H_{max}$  = 平衡時產氫量 (mL)

$\lambda$  = 遲滯期 (hr)

$t$  = 反應時間 (hr)

$R_{max}$  = 最大產氫速率 (mL/hr)

## 3.6 菌相分析

### 3.6.1 DNA 萃取

本實驗使用市面上販售之商業套件 (GeneMark DNA Extraction Kits) 來進行 DNA 的萃取。取 1 mL 之培養液至於微量離心管離心後取上清液，加入 200  $\mu$ l Extraction Solution 與微生物細胞進行充分混合後再液體與細胞混合均勻，置於 56°C 水浴槽 1 小時直至液體澄清組織完全分解。將分解完成的液體以 14000  $\times$  g 轉速離心 5 分鐘，將上清液移到新的微量離心管，並加入 4  $\mu$ l RNase A solution 靜置 5 分鐘。加入 200  $\mu$ l Binding Solution 上下翻轉微量離心管使之混合均勻，置於 70°C 的水浴槽中 10 分鐘，加入 200  $\mu$ l 酒精混合均勻後將混合液全部加入 Spin column 中離心 1 分鐘，將濾液丟棄並加入 300  $\mu$ l Binding Solution 清洗 1 分鐘，將濾液丟棄並加入 700  $\mu$ l Wash Solution 離心 1 分鐘，此步驟重複一次。去除濾液並離心 5 分鐘去除 Wash Solution 中的酒精，避免殘留的酒精干擾後續實驗，將離心完後的 Spin column 至於新的微量離心管中，加入 100  $\mu$ l 之 Elution Solution 靜置 1 分鐘，離心 1 分鐘後將 DNA 回收，儲存於 -20°C。

### 3.6.2 DNA 濃度與純度檢測

測量 DNA 樣品在 260 nm 及 280 nm 的吸光值可以得知 DNA 濃度及純度，其吸光值 260 nm 是核酸的濃度，而 280 nm 則是蛋白質中的濃度。DNA 樣品純度的計算方式為吸光值 260 nm/ 280 nm 之比值，比值範圍介於 1.8 – 2.0 為最佳的範圍。以雙股 DNA 來說，1 OD<sub>260</sub> = 50 (ng/ $\mu$ l)，所以依照下列公式 (式 3-3) 計算得以計算出核酸濃度：

$$50 \text{ (ng/}\mu\text{l)} \times \text{OD}_{260} \text{ of sample} = \text{Concentration of DNA (}\mu\text{g/ml)}$$

(式 3-3)

### 3.6.3 洋菜膠電泳

洋菜膠 (Agarose) 凝固後會形成為一個網狀的多孔結構，可有效的分離不同分子量大小的物質。在實驗時，依據 DNA 片段長度來配置不同濃度的洋菜膠 (Table 3-7)，最後可由完成後的電泳圖譜來判斷 DNA 片段長度及依照亮度來粗略估計 DNA 濃度。實驗方法如下：

使用 1X TAE buffer 配置所需濃度之洋菜凝膠，將膠體注入模具中等待乾燥，凝固後將 6X loading dye 與樣品以 5:1 的比例混合併注入膠片 Well 中，以 50V 的電壓在 1X TAE buffer 內泳動。完成後浸泡於溴化乙錠 (Ethidium bromide; EtBr) 溶液 (0.0005 mg/mL) 中染色 15-30 分鐘，再置於 UV 光下觀察。

Table 3-7 Agarose gel concentration for DNA fragments

Agarose gel percent (%)	DNA size (kbps)
0.5	0.8-25
0.7	0.5-15
1.0	0.3-12
1.5	0.2-10
2.0	0.1-2

### 3.6.4 聚合酶鏈狀反應

聚合酶鏈狀反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 是利用人工合成的引子 (primer) 為模板，選定特定範圍的序列進行 DNA 的擴增反應，利用溫度控制 DNA 的變性、引子黏合與引子的延伸 (27f + 1522r 及 341f + 926r)，不斷重複這三個循環使目標序列以倍數增加。本實驗之目標序列為細菌之 16S rDNA，將該片段進行擴增放大後以利於進行後續的實驗。在實驗之中使用的引子、操作參數整理如 Table 3-8 ~ 3-10。

Table 3-8 PCR primer use for 16S rDNA

Primer	Sequence (5' - 3')	Specificity
27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Bacteria
1522R	AAG GAG GTG WTC CAR CCG CA	Bacteria, Archaea
341F*	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Bacteria
926R	CCG TCA ATT CTT TGA GTT T	Universal

W=A,T; M=A,C;R=A,G

\*GC clamp = 5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCC GGG GCG GGG GCA  
CGG GGG G - 3'

Table 3-9 Temperature program in PCR reaction

Reaction	Activation	Denaturation	Annealing	Extension	Final
Temp (°C)	94	94	56~53	72	4
Time( min )	5	1	1	1	∞
Cycle	1	30			1

Table 3-10 Reagent concentration in PCR reaction

Components	Volume (μl)	Final conc.
10X PCR buffer	2.5	1X
dNTP mix	0.5	200 μM of each dNTP
Primer (R)	1	0.2 μM
Primer (F)	1	0.2 μM
Tag Polymerase	1	1.0 U/μl
Water	1	-
Template DNA	18	20 ng/μl
Total	25	-

### 3.6.5 變性梯度膠體電泳

為了瞭解瘤胃液抑制甲烷菌後微生物菌相的改變，以及在產氫醱酵中微生物菌群生長過程中的結構變化，使用變性梯度膠體電泳 (Denaturing Gradient gel electrophoresis; DGGE) 將不同微生物之序列分離，以利後續分析研究之用。DGGE 是根據 DNA 序列在不同濃度之變性劑 (尿素及甲醯胺) 下造成的解鏈程度不同使其在泳動過程之中有所變化，應而到達鑑定不同微生物種類之功能。DGGE 在應用上受到序列長度的限制，一般來說序列長度介於 200 - 700 會有較好的分離效果，故在擴增目標序列的時候需要使用到巢式 PCR 反應法，先使用較大一組引子擴增目標序列，再將這組反應完的產物以小片段引子再進行第二次 PCR 反應，此種 PCR 反應可以得到純度較高的 DNA 序列，在後續的實驗上分離效果也比較理想。

在本次實驗中使用引子 27f + 1522r 及 341f + 926r 擴增微生物之 16S rDNA 片段序列 (Table 3-11)，並在 forward 端添加 GC clamp，防止在泳動的過程中雙股 DNA 過度變性造成開鏈成為單股，在聚丙烯醯胺膠片中依據不同菌株序列組成配置 45% 至 55% 的變性範圍，觀察微生物結構之變化。

Table 3-11 Reagent of polyacrylamide gel

Reagent	45%	55%
40% Acrylamide/Bis	4 mL	4 mL
50X TAE buffer	0.4 mL	0.4 mL
Formamide (deionized)	3.6 mL	4.4 mL
Urea	3.78 g	4.62 g
ddH <sub>2</sub> O	To 20 mL	To 20 mL
Ammonium persulfate (APS)	0.1%	0.1%
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	8 $\mu$ l	8 $\mu$ l

### 3.6.6 Cloning of PCR-amplified 16S rDNA sequence

由於某些菌株序列過於接近，使用變性梯度凝膠電泳沒辦法完全將其分離，送樣結果顯示序列雜亂，故使用基因克隆的方式完成分離菌株之方法。

本實驗使用 T&A™ cloning kit 以及勝任細胞 *E. Coli DH5α* 做為載體，先將樣本從 DGGE 膠片切下後使用 QIAEX II Gel extraction kit 回收 DNA，再使用細菌之 16S rDNA 引子 341f + 926r 針對目標基因進行擴增。將 PCR 產物與 kit 內所附之 ligation buffer A 及 ligation buffer B 和 Vector 混合後置於 4°C 反應隔夜。將勝任細胞握於掌心解凍後置於碎冰上，把 ligation 完後的樣品加入裝有勝任細胞的離心管內，輕彈管壁使樣品與勝任細胞混合均勻並置於碎冰上 5 分鐘，接著在 42°C 的水浴槽反應 45 秒，反應完後再將樣菌液塗抹於平板培養基上。先準備含有抗生素 (50 µg/mL Ampicillin) 與藍白篩試劑 (0.5 mM X-gal 及 40 µg/mL IPTG) 之 LB 培養基，將轉殖完的勝任細胞均勻塗抹於 LB 培養基上，以 37°C 培養 16 小時。

Vector 本身帶有含抗生素之基因與一段半乳糖苷酶基因 (LacZ)，而在半乳糖苷酶基因上含有質體的切點 (Fig 3-5)，當有外源 DNA 嵌入時會造成半乳糖苷酶酵素失活，使菌落呈現白色形態；若是沒有外源 DNA 干擾，半乳糖苷酶則會和 X-gal 產生反應呈現藍色。在挑菌時挑選有嵌入外來 DNA 的白色菌落，劃盤於含有藍白篩之培養基上再次確認。培養完後使用滅菌後的牙籤挑取菌株並混合於配置好的 PCR 反應溶液中，使用 M13 引子進行 Colony PCR，再使用凝膠電泳確認目標基因是否嵌入載體，最後再將成功嵌入序列之樣品交由定序公司委託序列定序。

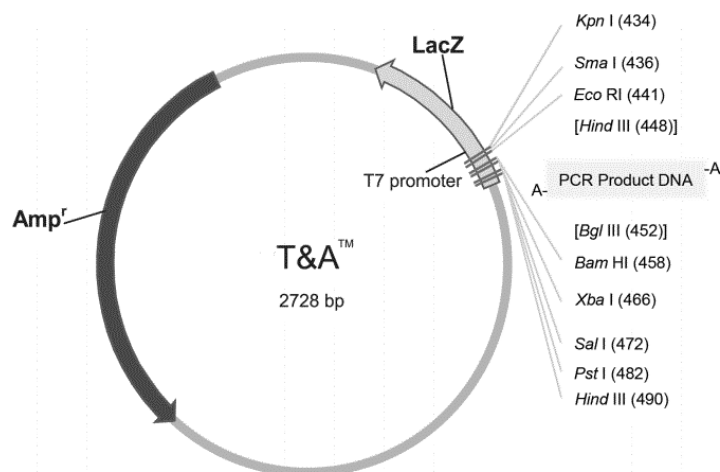


Fig 3-5 Sequence reference points of T&A™ Cloning Vector.

301	TACGCCAGCT	GGCGAAAGGG	GGATGTGCTG	CAAGGCGATT	AAGTTGGGTA
	ATGCGGTCGA	CCGCTTTCCC	CCTACACGAC	GTTCCGCTAA	TTCAACCCAT
	<b>M13 Forward Primer</b>				
351	ACGCCAGGGT	TTTCCAGTC	ACGACGTGT	AAAACGACGG	CCAGTGAATT
	TGCGGTCCCA	AAAGGGTCAG	TGCTGCAACA	TTTTGCTGCC	GGTCACTTAA
	<b>T7 Promoter</b>				
401	GTAATACGAC	TCACTATAGG	GCGAGCTCGG	TACCCGGGCG	AATCCAAGC
	CATTATGCTG	AGTGATATCC	CGCTCGAGCC	ATGGGCCCGC	TTAAGGTTTCG
		<i>Bgl</i> III	<i>Bam</i> HI	<i>Xba</i> I	<i>Sal</i> I <i>Pst</i> I
451	TT	AGATCTGGAT	CCCCTCTAGA	GTCGACCTGC	AGGCATGCAA
	AA	TCTAGACCTA	GGGGAGATCT	CAGCTGGACG	TCCGTACGTT
	<i>Hind</i> III				
493	CGTTGGCGTA	ATCATGGTCA	TAGCTGTTTC	CTGTGTGAAA	TTGTTATCCG
	GCAACCGCAT	TAGTACCAGT	ATCGACAAAG	GACACACTTT	AACAATAGGC
		<b>M13 Reverse Primer</b>			

Fig 3-6 Multiple cloning site sequences of T&A™ Cloning Vector.

### 3.6.7 親緣分析

將克隆完後的樣本委託明欣生物科技有限公司進行序列定序，待定序完後將收到的序列資料以 MEGA 軟體將序列進行修飾，再上網至 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 之基因資料庫 (Gene Bank)

以 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 進行比對，搜尋與樣品序列相似之序列資料。將比對後相似之序列下載，並以 MEGA 6 軟體將所有序列進行 Alignmeny，接著繪製親緣關係樹圖。在統計分析設定上選擇最大似然法 (Maximum Likelihood)，分析條件 Bootstrap Replication 進行 500 次重複分析。

### 3.7 RSM 實驗設計

本研究探討了培養溫度、pH 以及亞鐵離子濃度對產氫的最佳化條件，在因子的選擇上，由於茶葉含有的茶多酚對產氫醱酵以及微生物的活性影響有許多不確定之因素，因此在因子的選擇上將基質濃度的變因排除，固定於 20 g/L 的條件下進行其它因子的反應。

經過先前培養最適化實驗結果將條件設定下：溫度 50 - 60°C、pH 5 - 8、亞鐵離子濃度 0 - 400 mg/L，以這三項為變因設計出由 8 個二水準角點設計、6 組軸點設計和中心點重複 5 次共計 19 組實驗 (Table 3-12)，並在不同時間點監測氣相、液相產物，並以統計軟體 Minitab 計算出最佳反應條件。



Table 3-12 Experimental design for optimizing fermentative hydrogen production

Run	Temperature		pH		Fe <sup>2+</sup>	
	X <sub>1</sub>	x <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	x <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	x <sub>3</sub>
1	50	-1.68	6.5	0	200	0
2	53	-1	5.6	-1	320	1
3	53	-1	5.6	-1	80	0
4	53	-1	7	1	320	1
5	53	-1	7	1	80	-1
6	57	0	8	1.68	200	0
7	57	0	5	-1.68	200	0
8	57	0	6.5	0	400	1.68
9	57	0	6.5	0	0	-1.68
10	60	1	7	1	320	1
11	60	1	5.6	-1	320	1
12	60	1	5.6	-1	80	-1
13	60	1	7	1	80	-1
14	65	1.68	6.5	0	200	0
15	57	0	6.5	0	200	0
16	57	0	6.5	0	200	0
17	57	0	6.5	0	200	0
18	57	0	6.5	0	200	0
19	57	0	6.5	0	200	0

註：Run15~19 為中心點，重複 5 次

## 第四章 結果與討論

### 4.1 基質成份組成分析

茶葉之化學需氧量為 1.5 COD g/L，其木質纖維素組成如 Fig 4-1，纖維素、半纖維素及木質素組成分別為 28%、20% 以及 6%，s 剩下則是由一些可溶性碳水化合物、蛋白質、脂質及一些維生素所組成。在植物纖維素的構造上，木質素將纖維素以及半纖維素包裹住形成複雜的結構，而木質素又是以難以水解的苯丙烷單體所組成，因此若是木質素所占比例高的話會影響微生物水解的功效。由於茶葉的部位是在葉片的位置，所以木質素所占比例也就相對的較低，除了一些細胞內容物外，剩下大約 50% 的纖維素及半纖維素都是微生物較好水解利用的。

茶葉與目前常見之纖維素水解產氫醱酵基質成分組成比較如 Table 4-1，茶葉在纖維素的含量中比起稻稈、玉米桿、柳枝稷及稻殼相比沒有特別高，但木質素的含量卻是遠遠低於這些原料，明顯有著低木質素含量之優勢，在產氫醱酵上就可以省下許多基質前處理的過程，減少能源的消耗。

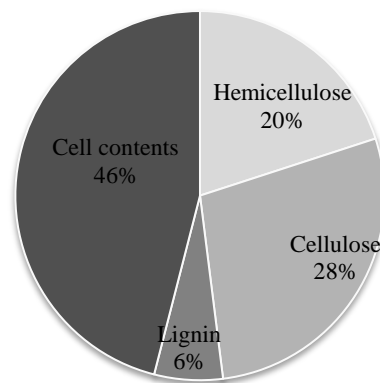


Fig 4-1 Composition of tea leaves fiber. Cell contents included soluble carbohydrates, proteins, lipids, minerals and vitamins

## 4.2 嗜熱菌種之培養

本研究選用了由東海牧場荷仕登乳牛採取之瘤胃液做為纖維素水解產氫之菌種來源，將採回來的瘤胃液按照反應體積 10% 之比例植入血清瓶內，培養中基質為一般使用碳粉印表機影印之廢紙(市售一般 A4 影印紙)5 g/L，並在 55°C 高溫的環境之下進行培養出嗜熱微生物菌群。經過 5 個世代培養後，瘤胃液菌群能在五天之內將纖維素完全分解 (Fig 4-2)，經過氣相層析儀分析氣體組成，主要產生出之 Biogas 以甲烷、氫氣為主，但在代謝過程中因甲烷菌會將氫氣利用轉換成甲烷及二氧化碳，所以氫氣的累積較甲烷來的低。液相代謝產物主要為乙酸以及丁酸和少量的丙酸和乙醇，在培養 5 天後乙酸的累積到達了 1534 mg/L，由此判斷此菌群主要代謝途徑為乙酸 (Fig 4-3)。



Fig 4-2 Biodegradation of waste paper by thermophilic anaerobic microorganisms from rumen fluid.

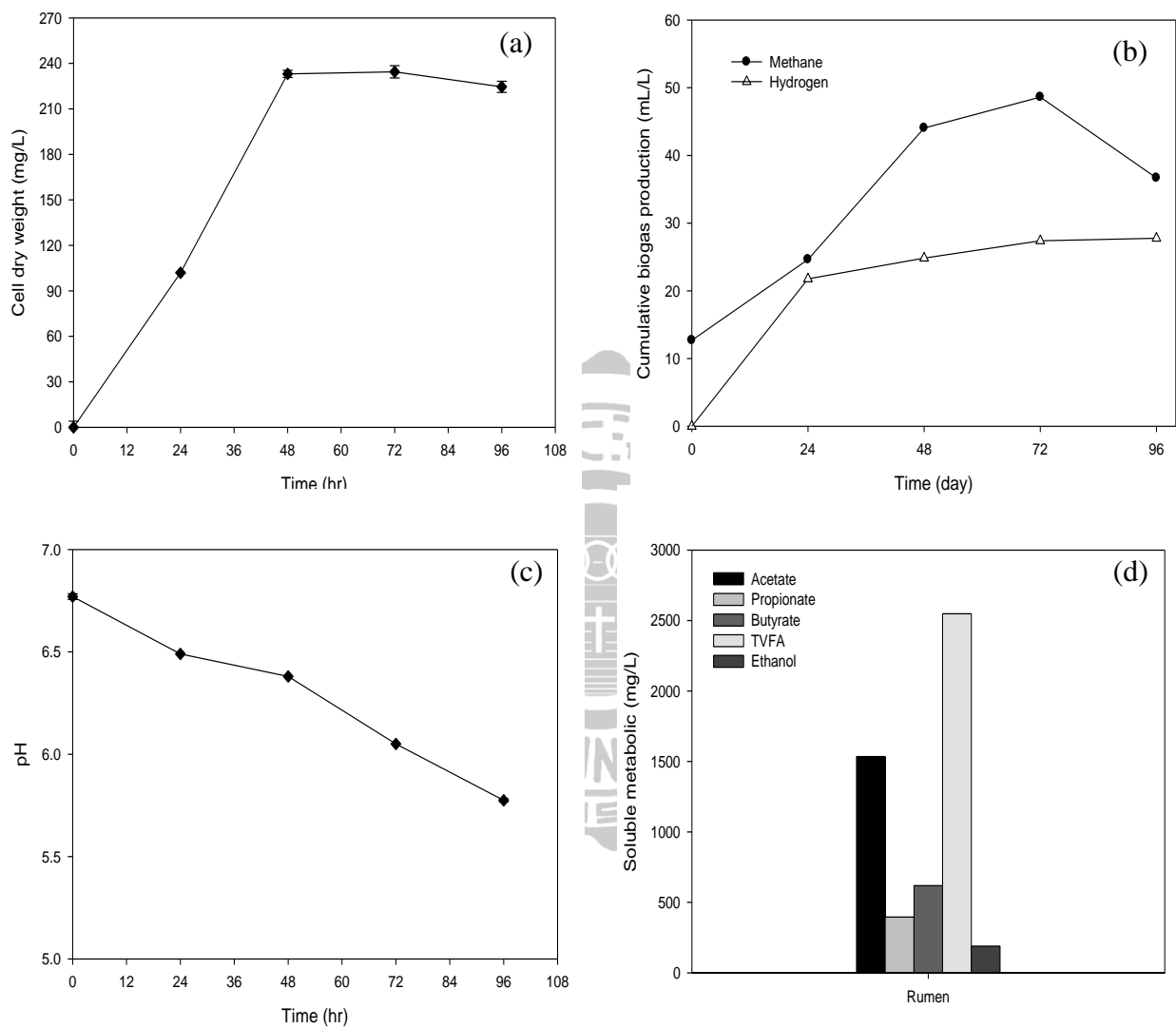


Fig 4-3 Cumulative biogas production by rumen bacteria. (a) microbial growth, (b) cumulative biogas production, (c) daily pH, (d) soluble metabolic, Culture were incubate at 55°C with 5 g/L waste paper. In this experiment, hydrogen production are less than methane.

### 4.3 甲烷菌抑制

瘤胃微生物菌群在培養 5 天內可以完全將纖維素水解完，並且確定氣相產物中有氫氣的存在，因此鎖定該菌群進行甲烷菌抑制試驗。在抑制實驗中選用了二硝基乙醇（2-nitroethanol, 2NEOH）、2-溴乙基磺酸鈉（2-bromoethanesulfonate, BES）、硝酸鈉（Sodium nitrate, SN）以及熱處理四種不同方式比較抑制後氫氣醱酵之情形，每種抑制劑添加至培養基的最終濃度為 1.2 mM，熱處理則是將菌種植入培養基後在 121°C 之下滅菌 15 分鐘得到能產內孢子之產孢微生物，使用基質為 5 g/L 之廢紙。

結果如 Fig 4-3 所示，在五種不同抑制方法中使用 2NEOH 抑制劑可以將甲烷菌徹底的抑制，培養的 5 天中沒有監測到甲烷的產生，氫氣在培養 12 小時的時候就開始累積，累積產氫量最高為 291 mL/L。pH 在經過 2NEOH 抑制後並沒有太大的變化，在培養 96 小時後降到 pH 6.1 左右。總揮發性脂肪酸與沒抑制甲烷菌的菌群相比少了將近 1400 mg/L，主要的差異變化在乙酸產量上，2NEOH 抑制後乙酸累積產量為 2260 mg/L，沒抑制的則為 3859 mg/L。經 2NEOH 抑制後丙酸的產量從 121 mg/L 下降至 39 mg/L，在醱酵時丙酸的累積是較不利於產氫的，經抑制後丙酸明顯的減少，有利於在醱酵中氫氣的生產。

經過熱處理的實驗組在 24 小時後才開始有少量的氫氣產出，最後累積產氫量為 145 mL/L，這是因為產孢菌從孢子萌芽成細胞需要一段時間來作用，因而造成生長延遲，所以不管在氣相產物或是液相代謝產物的累積都較少，pH 從初始的 pH 7.1 下降到了 pH 6.7，由於生長緩慢影響了代謝產物產量，所以酸化程度不是很明顯。從還原糖的數據顯示指出，在培養 24 小時後才開始有些微的水解作用，在微生物生長上細胞乾重只累積了 52 mg。熱處理與 2NEOH 兩者都能將產氫菌篩出，但熱處理只能保留下具產孢能力之菌株，在最後累積氫氣產量上熱處理得到之結果只有 2NEOH 的

一半。

使用 BES 做為抑制劑不能將甲烷菌徹底抑制，雖然甲烷產量比起沒添加抑制劑時有明顯的下降趨勢 (Fig 4-4 b)，但在氫氣的最高累積上卻只高出大約 15 mL/L (Fig 4-4 a)。在液相代謝產物的部分，乙酸有些微減少，但可能是因為抑制甲烷菌不完全所以總揮發脂肪酸與 2NEOH 相比還是高出 400 mg/L 左右，丙酸在累積上仍然有 89 mg/L。

SN 在甲烷菌抑制劑中沒有任何顯著的結果，在氣相代謝產物中累積產氫量以及累積甲烷都與沒抑制的沒有太大差異，液相代謝產物分析的結果也相差無幾，總揮發酸性脂肪酸在最後累積為 3588 mg/L。

BES 應用在甲烷抑制上非常廣泛，但在本實驗中發現到了 BES 無法完全將甲烷抑制住的情形，這個結果也在 Zhou 等人研究中發現相同趨勢 (Zhou *et al.*, 2011)。這可能是因為抑制劑所添加量不足所導致，本實驗所添加之最終濃度 1.2 mM 和 Zhou 等人添加濃度 12 mM 均有抑制不完全的現象，但是在 Danko 等人之研究中添加 25 mM 之 BES 可以將甲烷完全抑制並且提升產氫 (Danko *et al.*, 2008)，因此推測 BES 添加之濃度也會影響抑制的效果。

在相同抑制濃度之下 2NEOH 比起 BES 抑制能得到較好的結果，從累積氫氣的結果中與熱處理的方式比起能保留住更多具產氫能力之微生物，並且在十個繼代培養後也沒有任何甲烷的生成，因此後續實驗使用 2NEOH 抑制後的菌液。

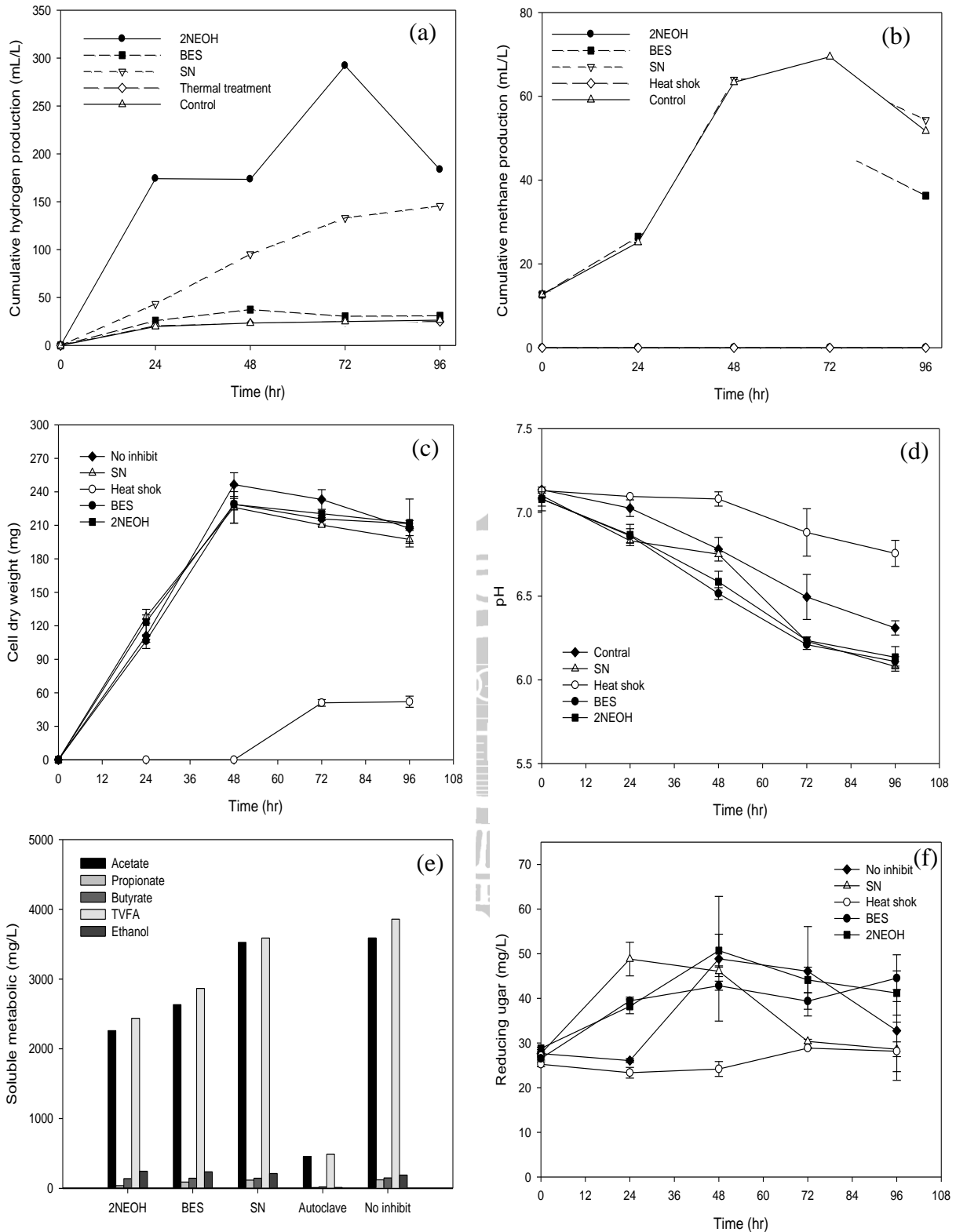


Fig 4-4 Inhibition effect of various inhibitors on methanogenesis by rumen mixed flora (a) cumulative hydrogen production, (b) cumulative methane production, (c) microbial growth, (d) daily pH, (e) soluble metabolic, (f) reducing sugar. Cultures were incubated at 55°C with 5 g/L waste paper.

Table 4-1 The compositions of different hydrogen production feedstock  
(Abbas *et al.*, 2009)

Type	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	Cell contents
Rice straw	40%	26%	13%	21%
Corn stover	38%	25%	17%	20%
Rice hulls	30%	34%	13%	23%
Switchgrass	33%	26%	18%	23%
Tea leaves	28%	20%	6%	46%

Cell contents = soluble carbohydrates, proteins, lipids, minerals and vitamins

## 4.4 環境影響因子

### 4.4.1 不同溫度對水解產氫之影響

培養溫度對於微生物的生長可是說有著顯著的影響，為了後續探討以廢茶葉為基質並進行反應曲面統計分析，必須先找出一個適當的溫度生長範圍。本次實驗使用 5 g/L 茶葉渣為基質，探討在不同溫度培養下的生長、代謝情形。

結果如 Fig 4-5 和 Table 4-2 所示，在溫度過高和太低的培養之下會對微生物的生長活性直接造成影響。在 65°C 的溫度培養下，培養時間經過 120 小時後 pH 仍然維持在 7，在液相代謝產物中也沒有分析到揮發性脂肪酸的累積，還原糖的濃度變化同樣的也幾乎呈現水平沒有變動。液相、氣相以及細胞量顯示結果都指出在此溫度下培養抑制了微生物的生長活性，沒有任何代謝活動進行。

在培養溫度 50°C 和 55°C 之下微生物皆有生長及代謝活動，但是在 50°C 的培養下較不利於細胞的生長，細胞濃度最高僅只有 118 mg/L，而在 55°C 的培養下微生物生長活性較佳，細胞濃度最高達到了 196 mg/L。在氣相產物的部分，於 50°C 培養時 biogas 以及氫氣產量也較為低，在累積產氫上不超過 80 ml/L；而在 55°C 培養的時候氫氣的累積在培養第 92 小時候可以累



積到 82 ml/L，氫氣濃度為 4.92%。在基質水解比例的部分，藉由培養前後基質乾重差來推算基質水解效率，50°C 和 55°C 在基質降解上僅只有 19.64% 和 24.81%，水解效果不理想。兩者在還原糖濃度變化上顯示曲線呈現平穩狀態，水解狀況較不明顯。在揮發酸的累積上兩者在乙酸的累積量上相差無異，但是在 50°C 培養的時候會造成丙酸的累積 (Fig 4-5 e)，累積的量高於在 55°C 的培養，乙醇的累積也同樣高於 55°C 培養。

瘤胃產氫腸胃道菌群在 60°C 下的培養下能得到最大的細胞生長 (Fig 4-5 a 及 Table 4-2)，細胞乾重最高可達 224 mg/L，最大產氫量約為 137 mL/L，氫氣的濃度為 7.18%，基質的降解率為 32.87%，還原糖從初始的 24 mg/L 開始累積至 35 mg/L，接著緩緩下降減少；總揮發性脂肪酸的累積濃度為 6674 mg/L，其中乙酸之累積濃度為 5033 mg/L，pH 隨著代謝物產生而緩緩下降，從初始之 pH 6.9 開始培養到 120 小時後 pH 下降至 pH 6.3。

從實驗證明，該菌群最適生長溫度在 60°C 的培養條件下生長活性、水解反應以及產氫酵素的作用都能達到最大的反應量，因此後續實驗將由此培養溫度計續進行。

Table 4-2 Comparison of substrates hydrolysis and hydrogen production at different temperature

	50°C	55°C	60°C	65°C
Specific growth rate (hr <sup>-1</sup> )	0.01	0.01	0.03	-
Substrates degradation percentage (%)	19.64	24.81	32.87	-
Hydrogen yield ( mmol H <sub>2</sub> / g COD )	0.02	0.08	0.19	-
H <sub>2</sub> production rate (mL/L · hr)	0.89	1.97	2.30	-
H <sub>2</sub> content (%)	5.02	4.92	7.18	-

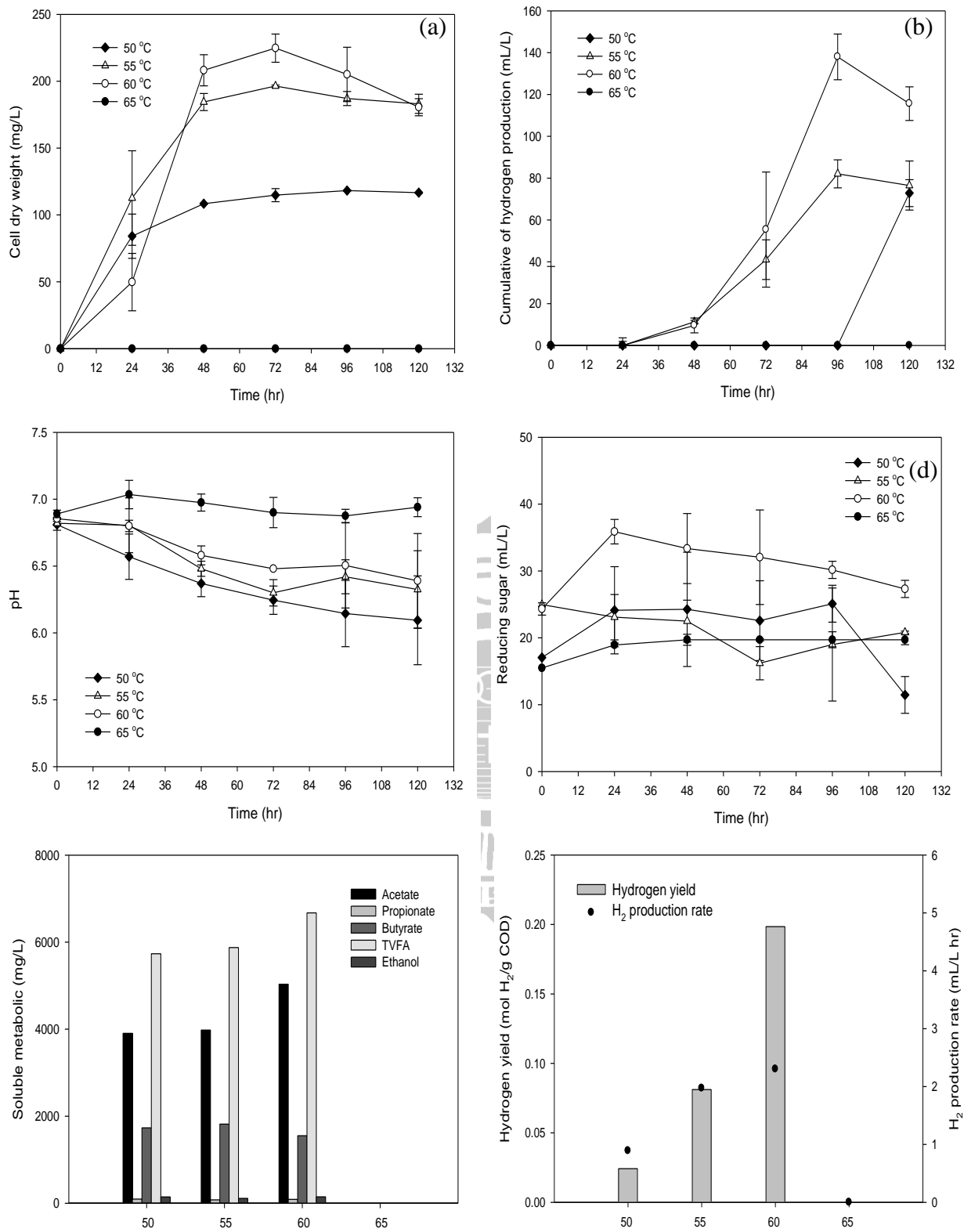


Fig 4-5 Effect of temperature on biohydrogen fermentation, (a) microbial growth, (b) cumulative hydrogen production, (c) daily pH, (d) reducing sugar, (e) soluble metabolic, (f) hydrogen yield and hydrogen production rate. Culture were incubate with 5g/L waste tea leaves.

#### 4.4.2 不同 pH 值對水解產氫之影響

纖維素水解酵素會被環境 pH 所影響，而不同的水解酵素所需的最佳 pH 範圍也不一，但一般來說 pH 值都被控制在一個能使三種水解酵素都發揮到極大的範圍做為實驗依據 (Li *et al.*, 2013)。

結果如 Fig 4-6 及 Table 4-3，大多數細菌所偏好的生長 pH 範圍約為 pH 7 左右，過高或是過低都會直接干涉到酵素作用活性。pH 5 之實驗組在培養 48 小時 pH 值已經降至為 4.8，低 pH 對微生物的生長、活性及代謝都會受到干擾比生長速率降至  $0.01\text{hr}^{-1}$ ，在細胞乾重最高只累積了 158 mg/L；產氫酵素的活性也大幅降低，在培養 120 小時後累積 biogas 也只有 585 mL/L，氫氣產量最高累積為 114 mL/L，氫氣濃度為 6.7%。纖維素水解作用也受到影響，在培養結束時只有降解 10.29% 的廢茶葉基質；還原糖也沒有明顯的累積，曲線呈現水平的趨勢。而在 pH 8 培養之下的結果顯示，微生物受到過高的初始 pH 所影響造成菌體無法生長，在培養期間沒有監測到任何氣相以及液相代謝產物的累積。

pH 7 從比生長速率看是與 pH 6 無差異的 (Table 4-3)，但 pH 7 在基質降解率可以達到 36.05%，氫氣產量與產氫速率也高達  $0.69\text{ mmol H}_2/\text{g COD}$  及  $2.33\text{ mL/L}\cdot\text{hr}$ ，氫氣的含量為 7.75%，而累積最高氫氣可達到 163 mL/L，高於 pH 6 的 128 mL/L。在液相產物的部分，pH 7 累積的總揮發性脂肪酸大幅高於 pH 6 所累積之產量 (8585 mg/L 及 8830 mg/L)，在還原糖的累積上 pH 7 從初始的 24 mg/L 開始緩慢的累積，在培養 96 小時的時候卻又大幅下降；pH 6 的還原糖濃度變化不大，培養開始緩緩的下降，到了 72 小時時候才開始有些許的增加。

然而從結果顯示，pH 5 氫氣的產量卻是高於 pH 6 以及 pH 7，這是因為 pH 5 的基質降解率低，經過換算後 1 g COD 能生產出的氫氣也就相對的高，所以也就造成了產氫量高於 pH 6 以及 pH 7 的現象。

本次批次實驗之最佳條件落在 pH 7，在此條件下馴養微生物菌群可以得到最佳的產氫結果，同時細胞乾重也累積至 202 mg/L 比起 pH 6 高出約 10 mg 的量；在氫氣產量上 pH 7 氫氣累積最高產量為 163 mL/L，pH 6 則為 128 mL/L，氫氣含量分別為 7.75% 及 7.25%，諸多結果顯示在此條件下氫化酶以及微生物活性代謝都較佳，因此後續實驗將以此條件繼續進行。

Table 4-3 Comparison of substrates hydrolysis and hydrogen production at different pH's

	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
Specific growth rate ( $\text{hr}^{-1}$ )	0.01	0.03	0.03	-
Substrates degradation percentage (%)	10.29	33.81	36.05	-
Hydrogen yield ( $\text{mmol H}_2/\text{g COD}$ )	1.27	0.59	0.69	-
$\text{H}_2$ production rate ( $\text{mL/L} \cdot \text{hr}$ )	0.41	1.36	2.16	-
$\text{H}_2$ content (%)	6.71	7.25	7.75	-

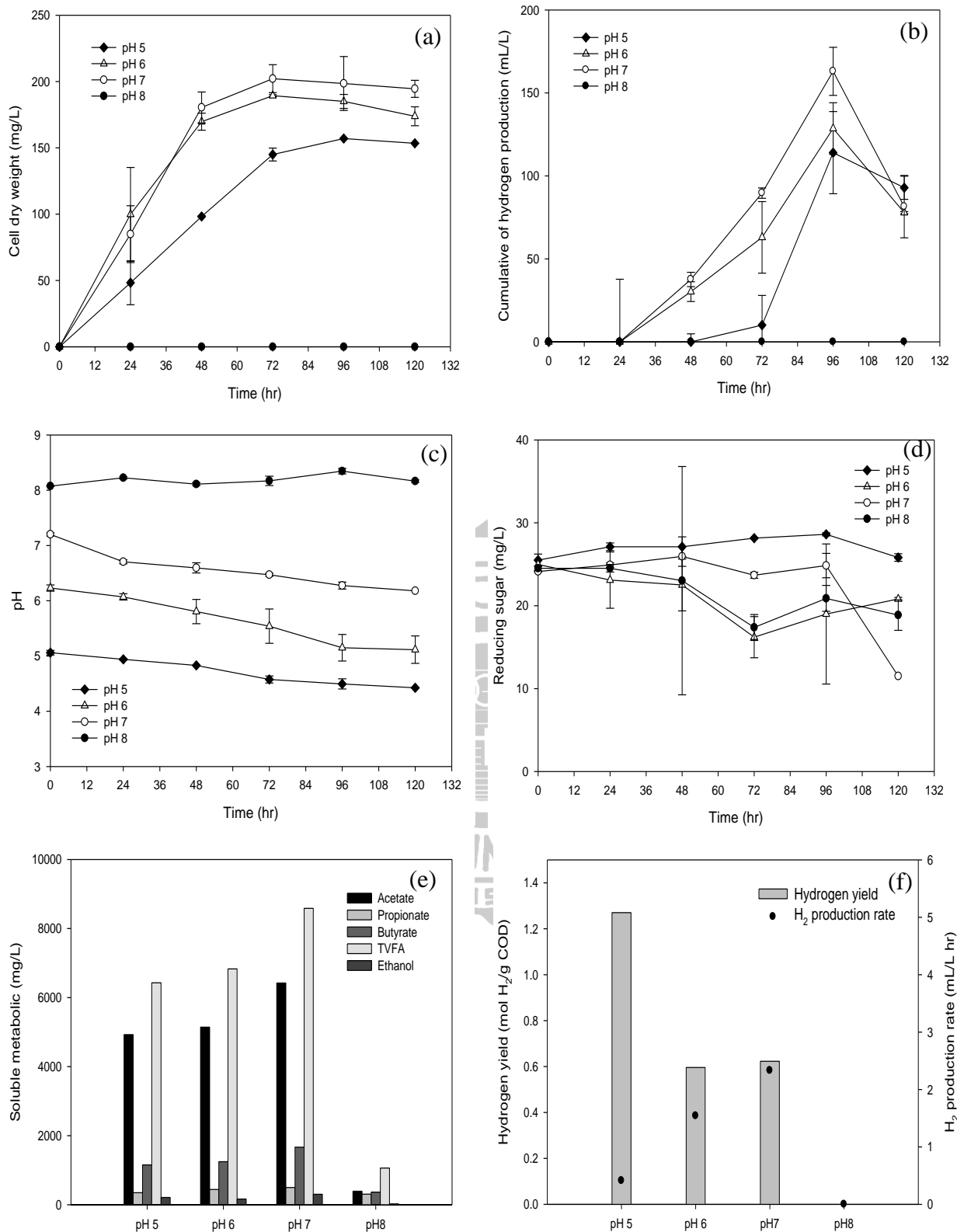


Fig 4-6 Effect of different pH's on biohydrogen fermentation, (a) microbial growth, (b) cumulative hydrogen production, (c) daily pH, (d) reducing sugar, (e) soluble metabolic, (f) hydrogen yield and hydrogen production rate. Culture were incubate at 60°C.

#### 4.4.3 不同基質濃度對水解產氫之影響

基質濃度對微生物的生長是個重要的影響因子，太少會影響微生物的生長代謝活性，太多則會造成過多副產物抑制細胞生長 (Yu *et al.*, 2002)。本次實驗以上次實驗最佳化的條件後做為基準，並進行不同基質濃度對產氫的評估。

微生物的生長、代謝隨著基質濃度增加而提高，在 5 g/L 的培養濃度下液相產物以及氣相產物都略低 (Fig 4-7)，pH 值從培養初期的 pH 7 開始緩緩下降，到最後維持在約 pH 6.5，總揮發酸的累積最後為 8568 mg/L，還原糖濃度從培養一開始的時候持續的下降，在第 48 小時維持持平的情況，最後在 96 小時則有些微的增加，最終濃度為 16 mg/L。基質濃度 10 g/L 的培養條件下不管是細胞乾重、液相產物的累積以及氣相產物都高於 5 g/L，在細胞的生長上，細胞乾重累積達到了 184 mg/L，pH 在培養最終的時候降至 pH 6.3，總揮發酸累積為 9022 mg/L。在累積產氫量上達到了 224 mL/L，氫氣的濃度增加至 4.85%，從兩組不同實驗中可明顯觀察到基質濃度增加後產物的變化。

在基質濃度 20 g/L 的培養下，氫氣的累積產量最高增加至 148 mL/L，比生長速率增加為  $0.03 \text{ day}^{-1}$ ，氫氣濃度、纖維素降解率、氫氣產量以及產氫速率也都是高於 5 g/L 及 10 g/L (Table 4-4)。在液相產物的部分，20 g/L 所累積之總揮發酸較高，所以 pH 值在培養最後的時候下降幅也大，從初始的 pH7 下降至 pH 5.9。還原糖在培養 24 小時後開始快速下降至 8 mg/L，但在 96 小時卻又大幅上升至 19 mg/L。

而在 30 g/L 培養之下，微生物受到基質濃度過高的影響，微生物的生長以及產氫酵素受到了抑制，細胞濃度最高累積只有 34 mg/L，僅為其它濃度的 1/6 而已。在氣相代謝產物上的累積也非常微量，累積氫氣產量僅為 15 mL/L。pH 在變化上較急驟，受到基質濃度的影響，在培養的 24 小

時內就快速的下降到 pH 5.5，基質的降解率僅只有 9.78%，氫氣含量也非常低，僅為 0.96%。相反的揮發性脂肪酸卻有明顯的累積，總揮發性脂肪酸累積為 11940 mg/L，高於 5 g/L 及 10 g/L。三者在此種基質的累積上差異不大，但是 30 g/L 之丁酸的產量卻是兩者的兩倍之多。在微生物代謝中進行乙酸發酵是較利於產氫的，根據先前的實驗顯示，此微生物菌群在代謝途徑中主要以乙酸發酵為主，培養於 30 g/L 基質濃度由於液相副產物的累積，不僅影響了生長，代謝路徑也受到了改變，丁酸的濃度大幅的累積，高於在 20 g/L 培養的條件下。

由結果得知，此瘤胃產氫菌群以廢茶葉基質 20 g/L 的濃度之下可以獲得較好的水解產氫結果，濃度過高不僅會抑制微生物之生長，代謝路徑也會轉向較不利產氫的丁酸發酵途徑。

Table 4-4 Comparison of substrates hydrolysis and hydrogen production at different substrates concentration

	5 g/L	10 g/L	20 g/L	30 g/L
Specific growth rate (hr <sup>-1</sup> )	0.02	0.02	0.03	-
Substrates degradation percentage (%)	32.24	33.81	36.05	9.78
Hydrogen yield (mmol H <sub>2</sub> /g COD)	0.72	0.83	0.94	0.13
H <sub>2</sub> production rate (mL/L · hr)	2.51	2.55	4.95	0.33
H <sub>2</sub> content (%)	3.70	4.85	7.70	0.96

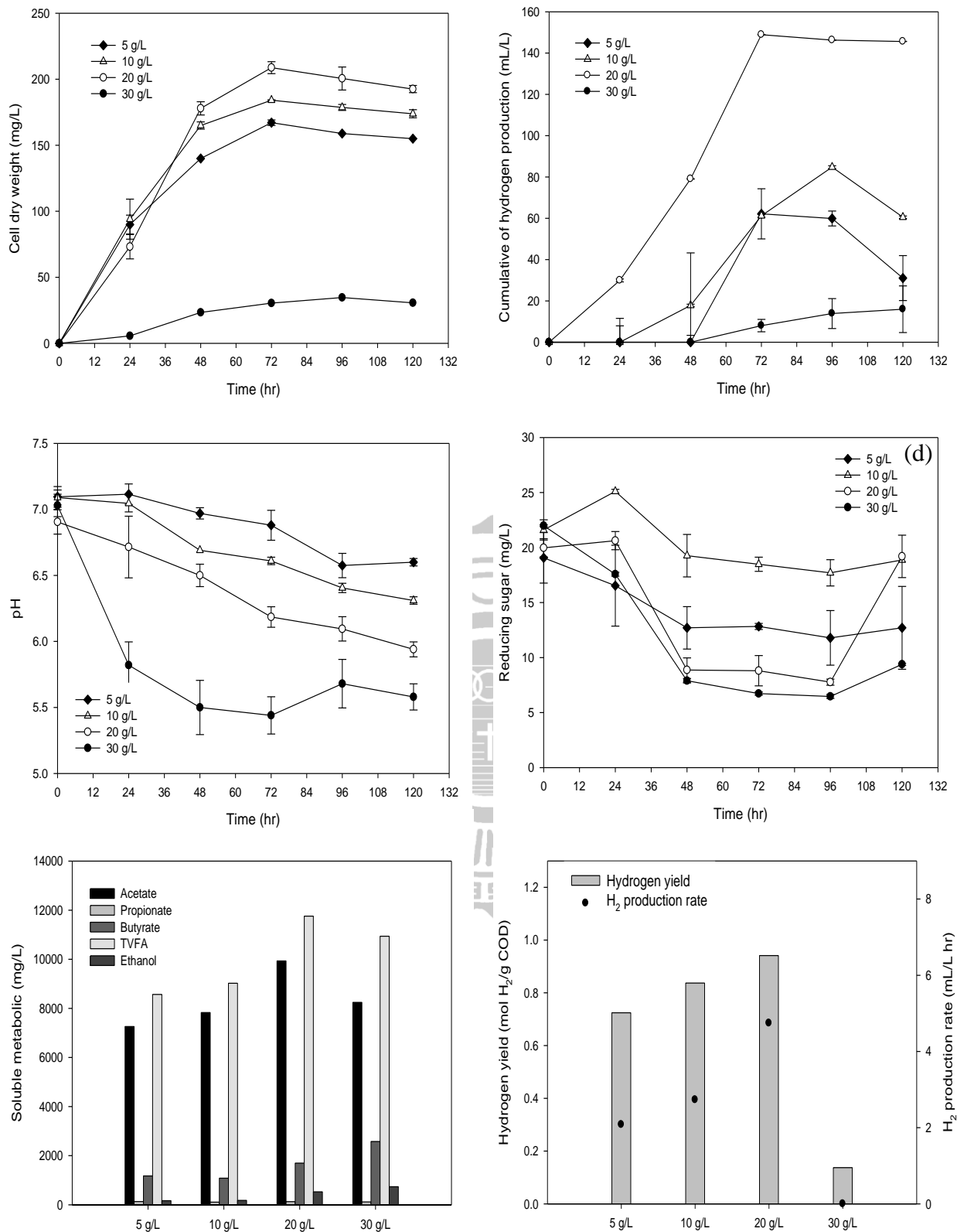


Fig 4-7 Effect of different substrates concentrations on biohydrogen fermentation, (a) microbial growth, (b) cumulative hydrogen production, (c) daily pH, (d) reducing sugar, (e) soluble metabolic, (f) hydrogen yield and hydrogen production rate. Culture were incubate with pH 7 at 60°C.



#### 4.4.3 不同亞鐵離子濃度對水解產氫之影響

已經有許多研究證明，在適當的濃度內額外補充亞鐵離子有助於產氫菌的生長以及提升產氫速率(Ding *et al.*, 2004)，Kim 和 Zeikus 研究指出，*Clostridium acetobutylicum* 代謝路徑從酸化至醇化時，生物體內的氫化酶以及產氫速率會逐漸減少 (Kim and Zeikus, 1985)，從外部額外補充適當濃度的亞鐵離子有助於保持氫化酶的活性，以及減緩鐵離子的消耗 (Lee *et al.*, 2001)。本實驗將條件設置在基質濃度 20 g/L、溫度 60 以及 pH 7 的條件下，將添加之 FeCl 濃度範圍設定在 0 mg/L ~200 mg/L，測試不同濃度之亞鐵離子對暗醱酵產氫之影響。

實驗結果如 Fig 4-8 及 Table 4-5，三種濃度雖然在基質的降解率上差異不大，不添加 2 mg/L 及 200 mg/L 分別為 32.14%、33.15% 以及 33.94%，但氫氣的產量明顯受到了影響，不添加 FeCl 的情況下在最終的累積最高氫氣只有 251 mL/L，氫氣的含量也只有約 13.12%；而在 2 mg/L 的濃度之下累積氫氣為 329 mL/L，氫氣含量 18.55%。當亞鐵離子濃度增加到 200 mg/L 時，氣相代謝產物以及液相產物明顯增加，產氫量以及產氫速率明顯提升至 1.02 mmol H<sub>2</sub>/ g COD 和 8.80 mL/L · hr，累積氫氣最高為 380 mL/L，氫氣濃度的也增加至 18.57%。

從批次實驗結果顯示，額外補充亞鐵離子對基質的水解作用沒有太大的影響，但在提升氫氣產量、累計產氫以及氫氣的含量都有顯著的差異。

Table 4-5 Comparison of substrates hydrolysis and hydrogen production at different ferrous ions

	Without FeCl <sup>+</sup>	2 mg/L	200 mg/L
Specific growth rate (hr <sup>-1</sup> )	0.02	0.03	0.04
Substrates degradation percentage (%)	32.14	33.15	33.94
Hydrogen yield (mmol H <sub>2</sub> / g COD)	0.80	0.96	1.02
H <sub>2</sub> production rate (mL/L · hr)	5.81	6.47	8.80
H <sub>2</sub> content (%)	13.12	18.55	18.57

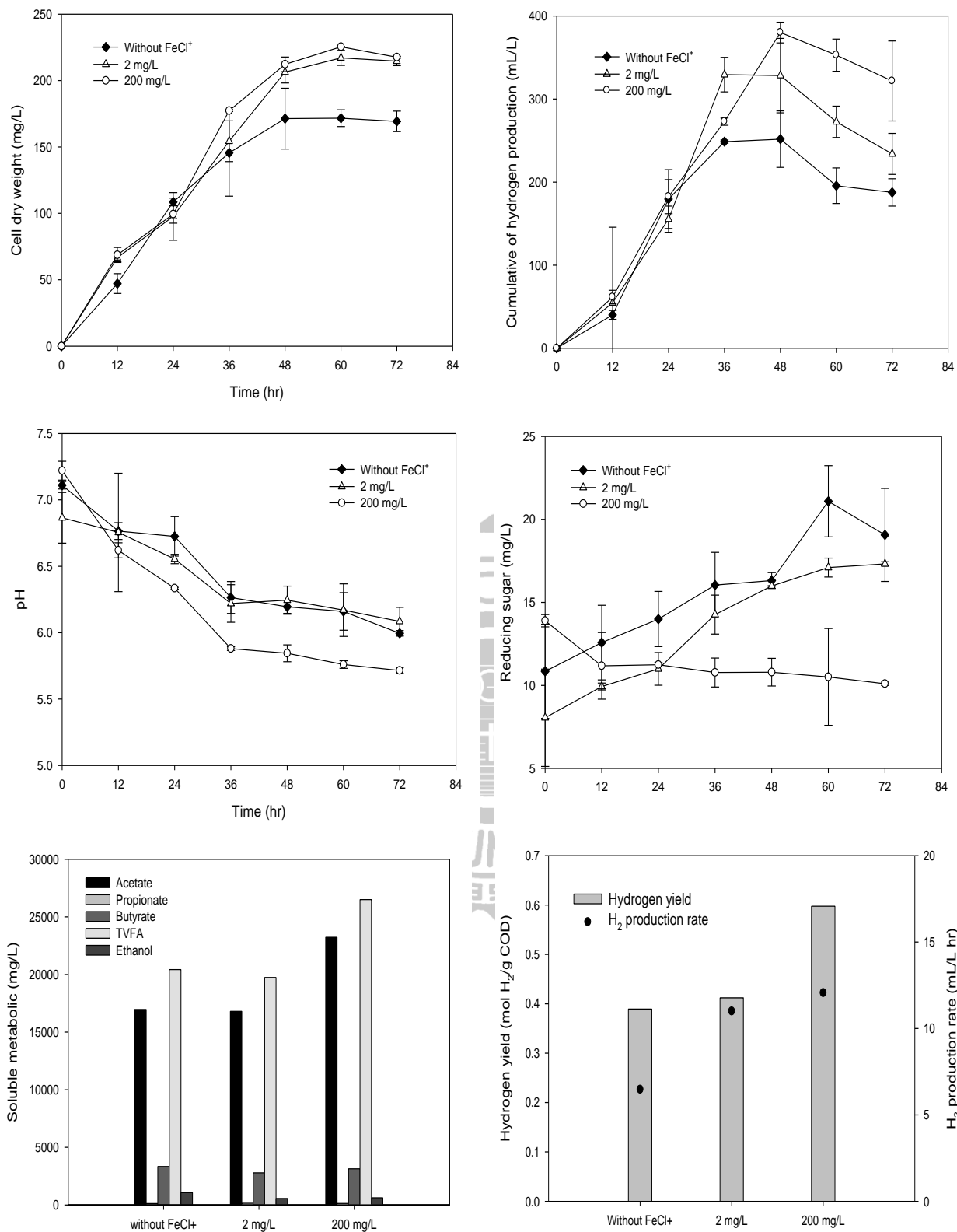


Fig 4-8 Effect of Fe<sup>2+</sup> concentration on biohydrogen fermentation, (a) microbial growth, (b) cumulative hydrogen production, (c) daily pH, (d) reducing sugar, (e) soluble metabolic, (f) hydrogen yield and hydrogen production rate. Culture were incubate with pH 7 at 60°C.

## 4.5 基質前處理

### 4.5.1 微波消化、酸處理

廢茶葉基質進行了不同前處理之產氫醱酵比較，希望藉由外力破壞纖維素結構，使微生物在水解的時候較好作用。將經過微波消化及酸處理後的基質進行固液分離，將液體收集後分別測量其還原糖濃度，做為前處理基質破壞程度之依據。

結果如 Fig 4-9 所示，微波消化在不同處理時間中以 8 分鐘所得到之還原糖量最高，也就是說木質纖維素在 8 分鐘的微波消化處理下破壞較徹底，所釋放出的還原糖量也相對的高。因此在微波消化的前處理實驗中選用 8 分鐘之處理組。在酸處理的實驗組，處理 45 分鐘後可以得到最高還原糖，因此的選用此時間做為酸處理之前處理。Fig 4-10 兩組前處理過後以電子顯微鏡拍攝在不同倍率下觀察的結果，可以很明顯的觀察到茶葉被破壞成細碎的粉狀，表面皺摺與未經處理過的樣本比起來也較多；酸處理的樣本纖維素結構破壞程度較無微波消化大，但仍然有明顯的結構破壞痕跡。

將微波消化處理時間 8 分鐘和酸處理時間 45 分鐘的樣本分別以 20 g/L 做為基質，在培養條件 pH 7、溫度 60°C 下培養，進行產氫醱酵的評估。結果如 Fig 4-11 所示，兩組經過預處理後的基質，微生物的生長活性完全受到了抑制，經前處理後的實驗組中皆沒有觀察到微生物的生長，在 pH、液相及氣相產物分析結果也顯示了沒有進行任何代謝活動。這可能是基質特性所導致，茶葉中存在著能抑制微生物生長活性的茶多酚，雖然是使用過後的廢茶渣，但茶多酚含量仍然很高 (Nishida *et al.*, 2006)，使用微波消化以及酸處理這種較劇烈的前處理方式雖然能將纖維素結構破壞的較完整，但也容易將茶多酚釋放，在配製培養基時經過高溫高壓滅菌的步驟後，這些茶多酚也就隨之釋放到了培養基裡。

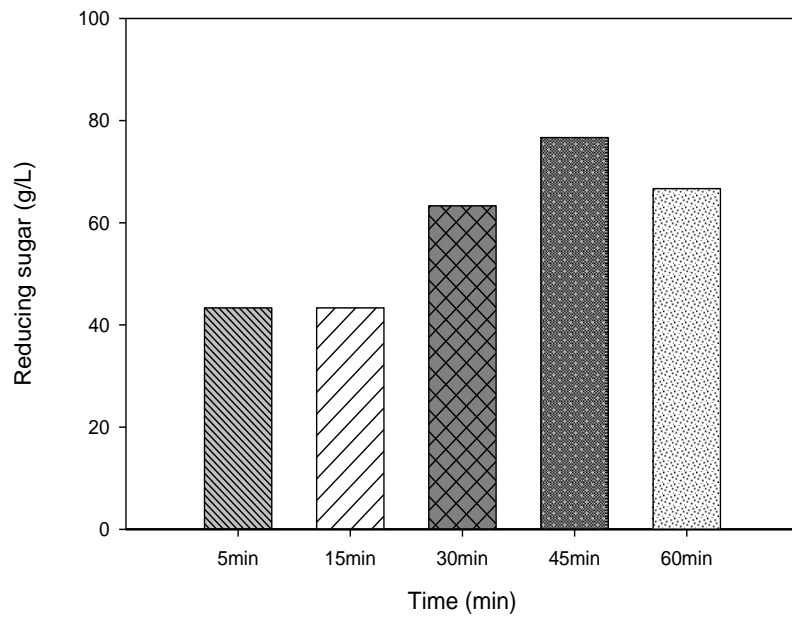
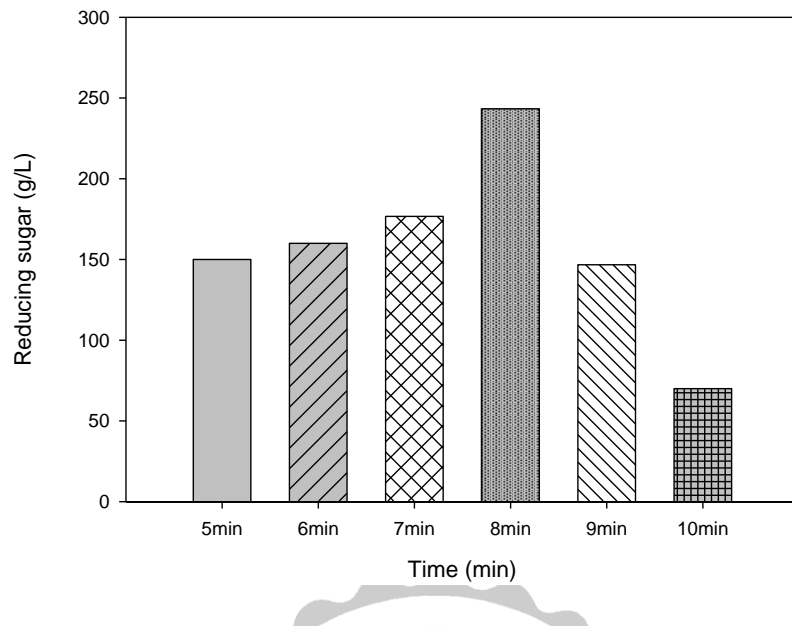


Fig4-9 Production of reducing sugar from pretreatment of waste tea leaves by (a) microwave treatment, (b) acid treatment.

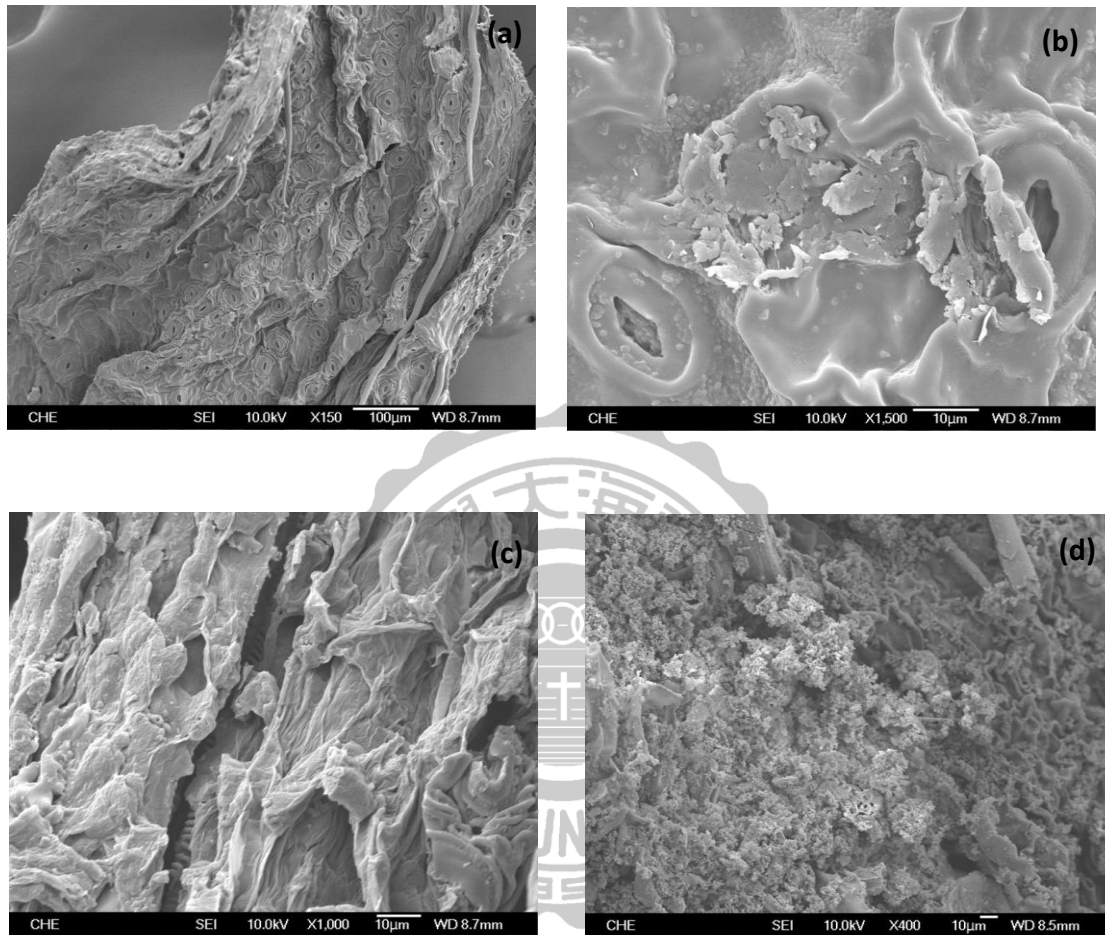


Fig 4-10 SEM image of (a) no pretreatment (magnification 150 $\times$ ) waste tea, (b) pretreatment form acid at 45 mint (magnification 1500 $\times$ ), (c) pretreatment by acid at 45 mint (magnification 1000 $\times$ ), (d) pretreatment by microwave at 8 mint (magnification 400 $\times$ ).

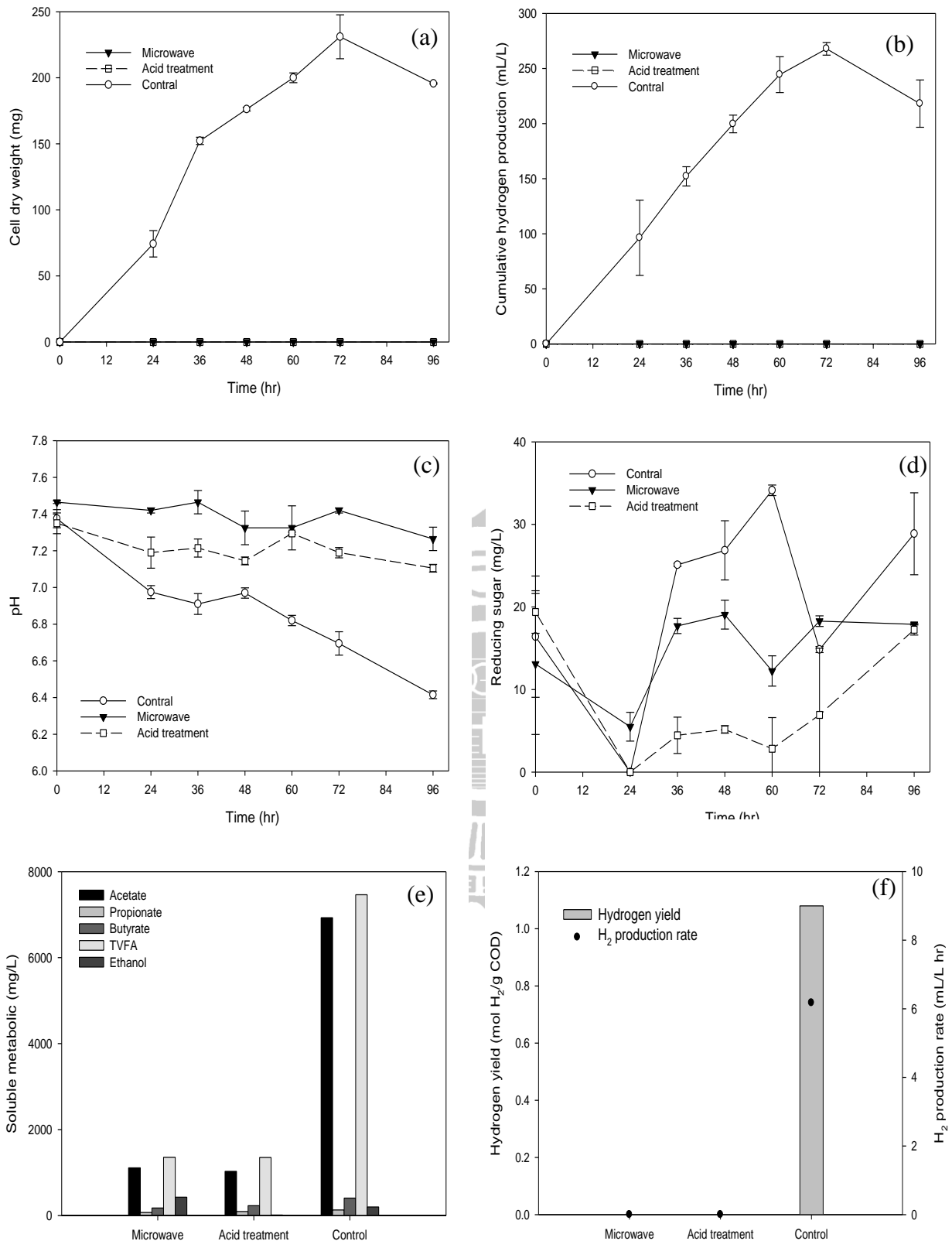


Fig4-11 Effect of different pretreatment on biohydrogen fermentation (a) microbial growth, (b) cumulative hydrogen production, (c) daily pH, (b) reducing sugar, (e) soluble metabolic, (f) hydrogen yield and hydrogen production rate. Culture were incubate with 20 g/L substrate at 60°C.

#### 4.5.2 茶多酚抑菌測試

從先前的實驗得知，茶多酚會對微生物生長造成直接影響，經過前處理後破壞了茶葉結構使得茶多酚更容易釋放至培養基中。為證實茶葉前處理中可能含有抑制微生物之茶多酚，將經 2NEOH 抑制後菌液進行稀釋後分別塗抹於含有茶多酚濃度 3572 mg/g 及不含茶多酚之 TA 培養基(含 agar) 培養基，培養於 55°C 下，計算培養皿中的菌落數。實驗結果如 Table 4-6，添加茶多酚之培養基確實對微生物菌群造成抑制，在實驗中 (7 day) 沒有觀察到任何的菌落數生長，而未添加茶多酚之培養基則是在原液的倍數下有觀察到微生物的生長，結果表明了茶多酚確實會影響微生物的生長。

Table 4-6 Effect of different dilution factor with add tea polyphenols and no addition

Dilution factor	Original	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
No addition (CFU/mL)	4	0	0	0	0	0	0
Tea polyphenols (CFU/mL)	0	0	0	0	0	0	0

TNTC = Too numerous to count

#### 4.5.3 熱處理

由於微波消化及酸處理破壞纖維素程度高，造成茶多酚大量釋放至培養基反造成抑制微生物生長，該次前處理實驗使用較溫和的方式處理。將 1 g 廢茶葉渣放入 50 mL 100°C 的沸水中煮，評估在 10 分鐘處理和 30 分鐘處理下的結果，並藉由測量液體中茶多酚的含量來評估前處理效率。茶多酚含量如 Table 4-7，處理 30 分鐘之樣品溶出較多的茶多酚，這表示了在前處理上 30 分鐘比 10 分鐘處理破壞程度較高，所以溶出之茶多酚也相對的比較高，因此後續實驗選用 30 分鐘處理組做為基質的前處理。圖 Fig 4-12 為從電子顯微鏡下觀察表面破壞結構，纖維素破壞程度較無微波處理以及

酸處理的大 (Fig 4-10)，但與未經處理的組別比較起來表面結構較鬆散，從表面可以觀察到散佈著些微的碎屑。將經 30 分鐘水煮後的基質乾燥，與未經處理的基質評估在產氫發酵上的效果。

經熱水前處理 30 分鐘後的基質在產氫上表現出良好的效果，細胞乾重比起沒處理的控制組多了約 30 mg/L，比生長速率也從 0.04 day<sup>-1</sup> 增為 0.05 day<sup>-1</sup>，在累積產氫上比起未經處理組多增加了 130 mL/L，固體基質的降解率則增加至 37.19%，產氫速率為 8.66 mL/L · hr。液相代謝產物在經過處理後累積也明顯上升，總揮發性脂肪酸增加至 23434 mg/L (Fig 4-13 e)。

實驗證明，使用熱水處理的茶葉基質確實能破壞茶葉表面纖維素結構，但破壞程度不足以釋放過多茶多酚，確實能達到增加水解及產氫效率的功效。

Table 4-7 Effect of different boiling on releasing polyphenols from wast tea leaves

Boiling time	Tea polyphenols (mg/mL)
10 minute	1993
30 minute	3542

Table 4-8 Biohydrogen production by using boiled waste tea leaves as substrate. Raw waste tea leaves withing boiling was used as control

	30 min	Control
Specific growth rate (hr <sup>-1</sup> )	0.05	0.04
Substrates degradation percentage (%)	37.19	31.10
Hydrogen yield (mmol H <sub>2</sub> / g COD)	1.13	1.07
H <sub>2</sub> production rate (mL/L · hr)	8.66	4.51
H <sub>2</sub> content (%)	18.49	12.72



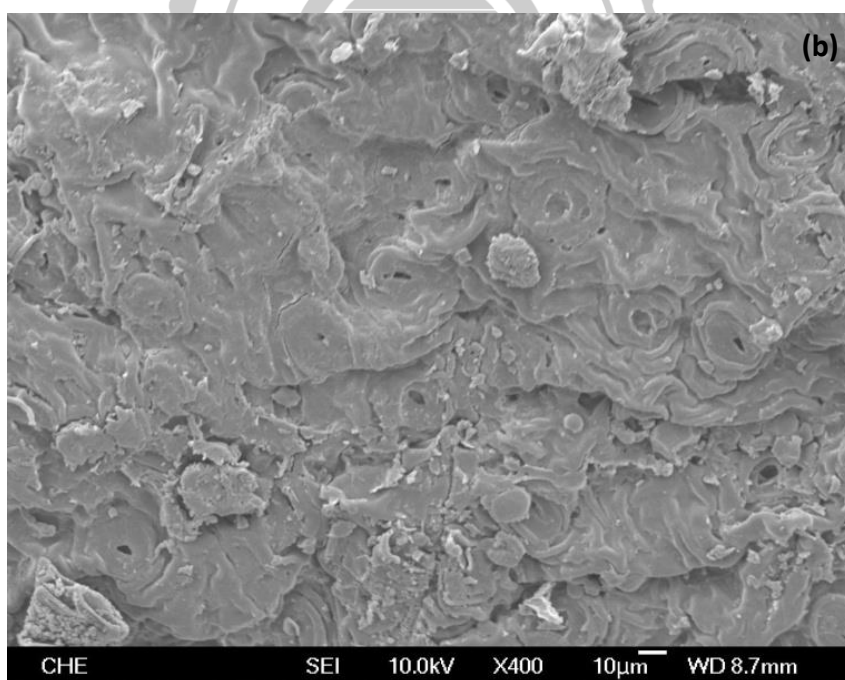
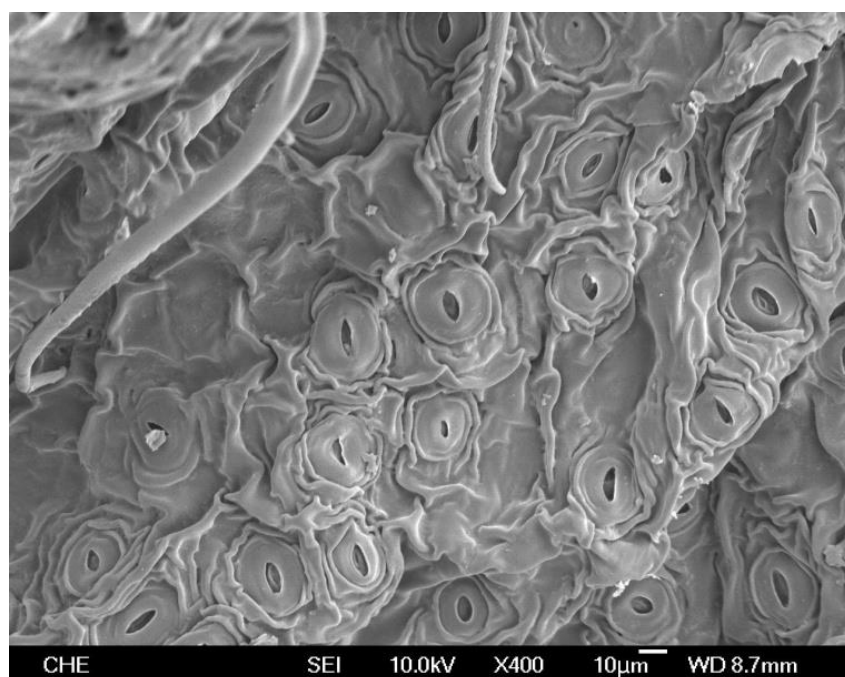


Fig 4-12 SEM image of (a) no pretreatment (magnification 400×) waste tea, (b) pretreatment form hot water at 30 min (magnification 400×).

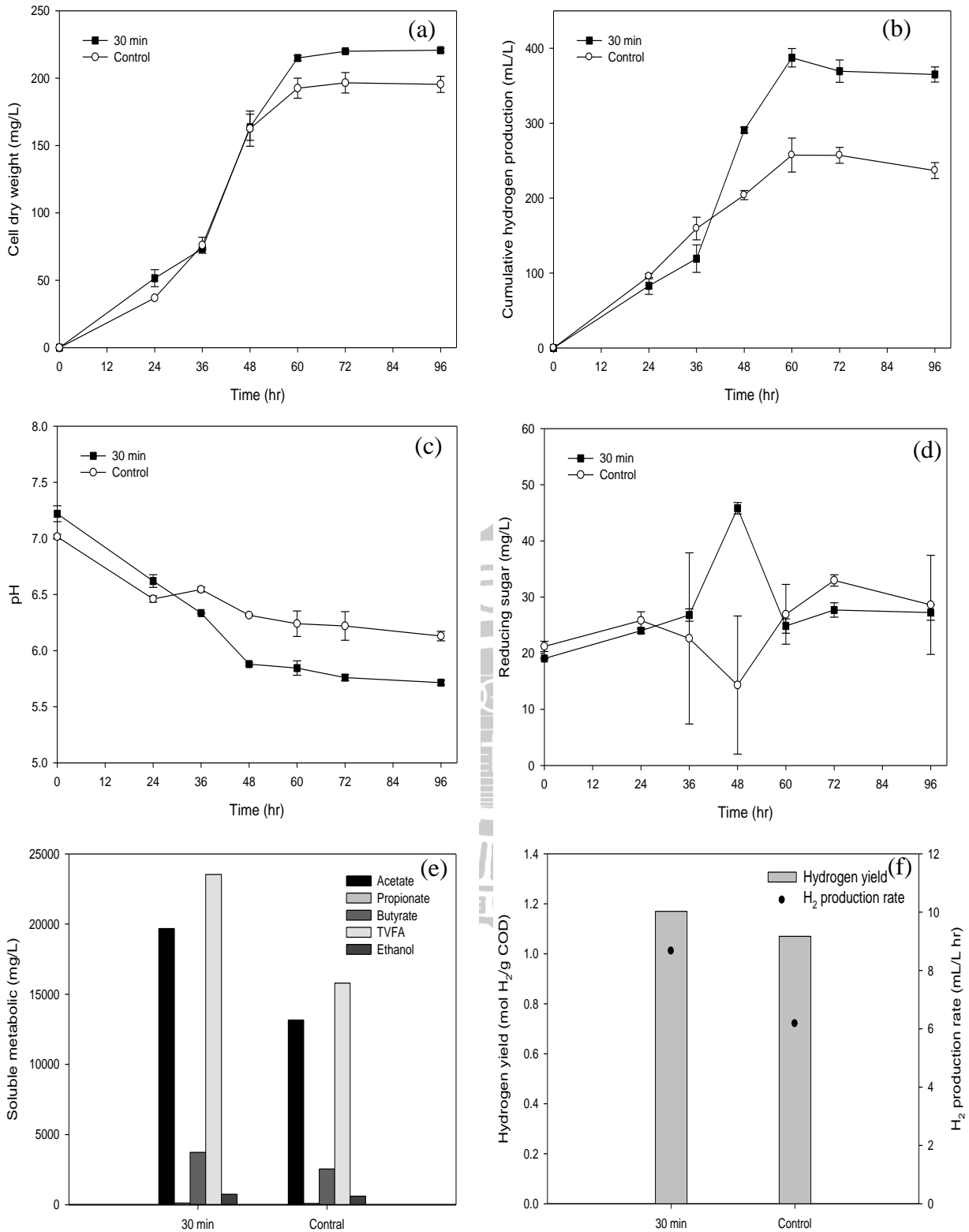


Fig 4-13 Effect of heating pretreatment of waste tea leaves on hydrogen fermentation, (a) microbial growth, (b) cumulative hydrogen production, (c) daily pH, (b) reducing sugar, (e) soluble metabolic, (f) hydrogen yield and hydrogen production rate. Culture were incubate with 20 g/L substrate at 60°C.

## 4.6 反應曲面最佳化

### 4.6.1 實驗因子與設計範圍

本實驗將基質濃度固定在 20 g/L，選用了不同 pH、培養溫度以及亞鐵離子濃度這三個變數做為實驗因子，pH 範圍介於 5~8、溫度範圍介於 50~65，亞鐵離子範圍在本實驗只做了 0~200 mg/L，在濃度 200 mg/L 的時候得到較好的效果，但考量反應曲面實驗設計需將極高點和極低點都包含在實驗中，尋找文獻後發現濃度高於 300 mg/L 後會開始對產氫造成抑制(吳, 2012；葉, 2011；Ding *et al.*, 2004)，因此將實驗範圍設定在 0~400 mg/L。

### 4.6.2 中心混成實驗結果

本實驗以統計軟體 MINITAB 分析，將三種因子與其各自實驗值範圍經中心混成後將實驗分為 19 組 (Table 4-9)，Run 1、6-9 以及 14 為軸點之設計，其數值為實驗設計範圍之極大值與極小值，在軸點上中心點的兩端進行實驗；Run 2-5 及 Run 10-13 為角點設計，此設計是為了使不同因子交互作用進行之分析；Run 15-19 為實驗設計之中心點，以設定範圍之中心點重複 5 次實驗，這是為了估計試驗誤差以及中心點之準確性，也可由此得之曲面之曲度。反應曲面實驗數據結果如 Table 4-9，Run1 及 Run14 分別為溫度因子的極小值與極大值 (50 及 65°C)，兩組實驗由於溫度介於反應的極端，微生物的生長都直接受到影響，所以在產氫量上兩者皆得到較小的結果 (0.67 mmol H<sub>2</sub>/ g COD 及 0.60 mmol H<sub>2</sub>/ g COD)。Run 6 及 Run 7 分別為 pH 的極大和極小值 (pH 8 及 pH 5)，從先前批次實驗中得知在這兩個 pH 條件培養之下生長、產氫效率都不佳，在 pH 8 的實驗中微生物生長、產氣及水解都受到了抑制。經中心混成實驗設計 Run 6 培養條件為溫度 57°C、pH 8 和亞鐵離子濃度 200 mg/L，但在混成反應之下 pH 8 的產氫速率達到了 1.04 mmol H<sub>2</sub>/ g COD。Run 8 及 Run 9 為亞鐵離子的極大

值和極小值 (400 mg/L 及 0 mg/L)，沒有添加亞鐵離子的 Run 9 產氫量低於有添加的 Run 8，分別得到了 0.74 mmol H<sub>2</sub>/ g COD 及 0.43 mmol H<sub>2</sub>/ g COD。在角點的實驗設計，Rum 2-5 及 Rum 10-13 兩組溫度分別為 53°C 及 60°C，pH 值都為 5.6 及 7，亞鐵離子濃度為 320 及 80 mg/L。在相同培養溫度之下，pH 7 以及亞鐵離子濃度 80 mg/L 都可獲得較高的產氫量，而在 60°C 培養下更勝於 53°C (Rum 5: 0.78 mmol H<sub>2</sub>/ g COD; Rum 13: 1.11 mmol H<sub>2</sub>/ g COD)。Rum 15-19 為中心點，實驗重複 5 次，培養溫度條件於 57°C、pH 為 6.5 以及亞鐵離子濃度為 200 mg/L，產氫量平均可得到 0.95 mmol H<sub>2</sub>/ g COD。



Table 4-9 Experiment design and experimental results for hydrogen production

Rum	Temp (°C)	Initial pH	Iron conc (mg/L)	HY*
1	50	6.5	200	0.67
2	53	5.6	320	0.74
3	53	5.6	80	0.70
4	53	7	320	0.58
5	53	7	80	0.78
6	57	8	200	1.04
7	57	5	200	0.65
8	57	6.5	400	0.73
9	57	6.5	0	0.74
10	60	7	320	1.10
11	60	5.6	320	0.69
12	60	5.6	80	0.86
13	60	7	80	1.11
14	65	6.5	200	0.60
15	57	6.5	200	0.78
16	57	6.5	200	1.01
17	57	6.5	200	1.08
18	57	6.5	200	0.96
19	57	6.5	200	0.96

\* HY : Hydrogen yield ( mmol H<sub>2</sub>/ g COD )

### 4.6.3 培養條件最佳化

經統計後以反應曲面法所得到之最適培養條件，培養溫度、初始 pH 值以及亞鐵離子三者對於產氫速率的常態機率圖 Fig 4-14 常態機率圖代表了實驗資料是否為常態分佈，以及是否有其它不確認的變數或是異常值的存在，X 軸之殘差值代表著每個點與 45 度線之距離；Y 軸百分比代表了在整個數據中資料的位置。從圖中可以觀察到，實驗數據點都緊貼著 45 度線往上延伸，沒有散落離線較遠的離群值，整體資料呈現了線性，這表示了在實際的實驗數據中所得到的結果沒有異常值，或是一些未確認的變數。

根據反應曲面統計所得到最佳培養條件為溫度 58°C、pH 7.2 及亞鐵離子濃度 160 mg/L 的培養條件，根據實驗條件與產氫量所求得知反應曲面圖及等高線圖如 Fig 4-15 至 4-17。

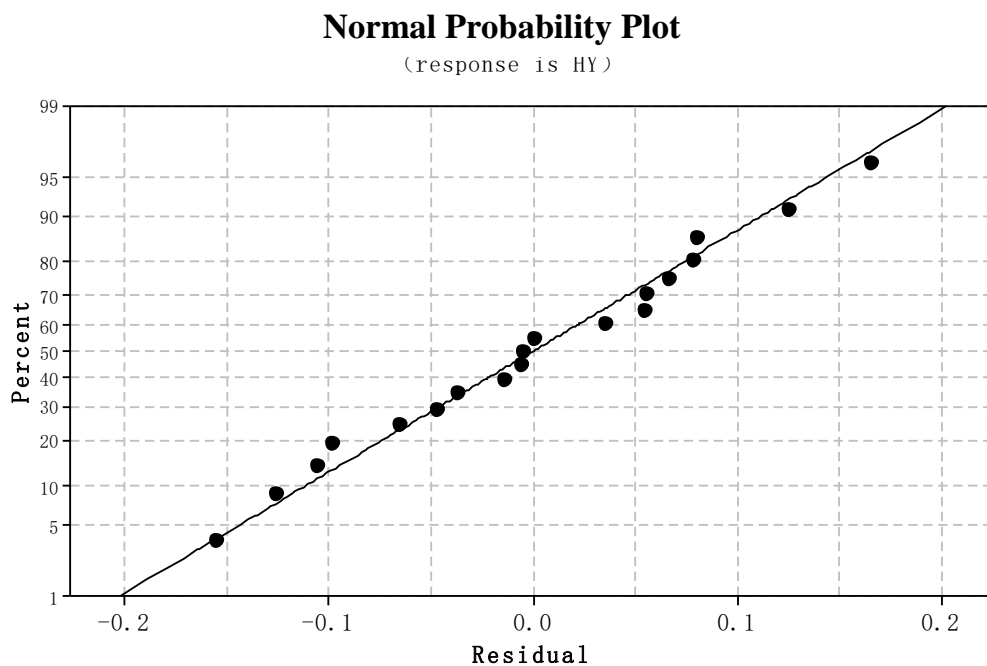


Fig 4-14 Result of normal probability plot, the experiment response is hydrogen yield. Those experiment data (point) roughly in a straight line, it means have normally distributed data.

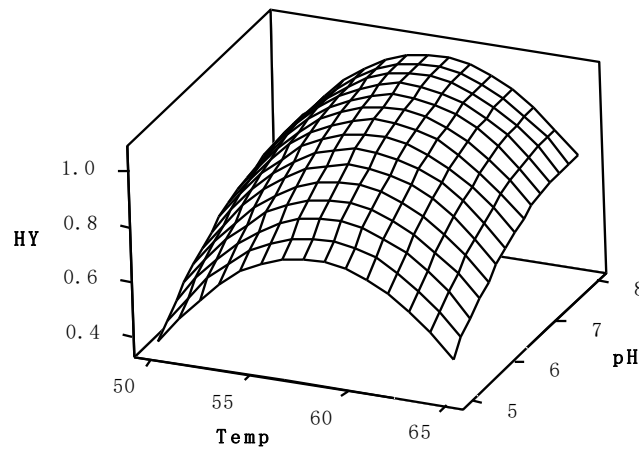
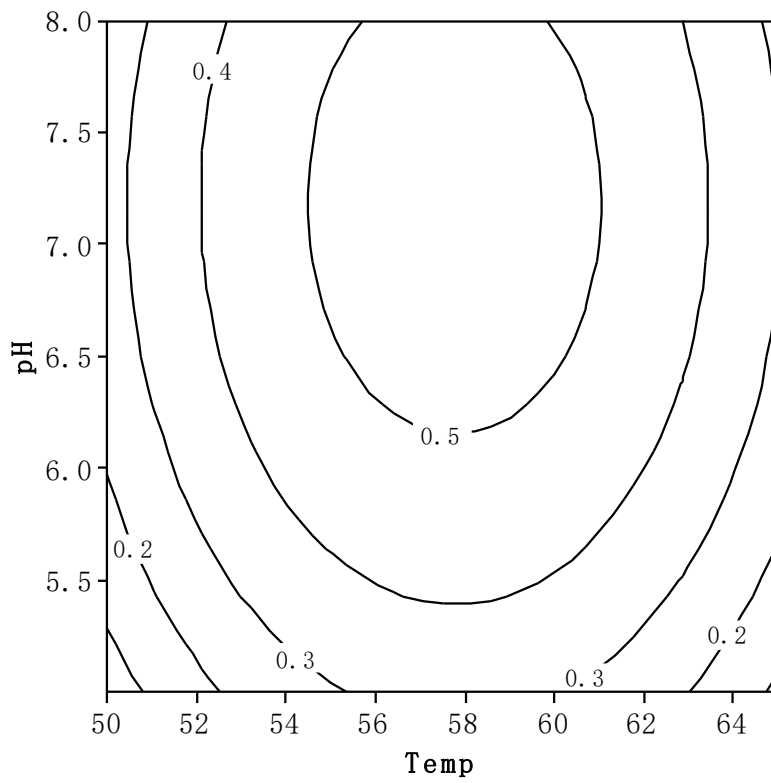


Fig 4-15 Response surface plot and contour plot showing the effect of the temperature and initial pH on hydrogen yield.

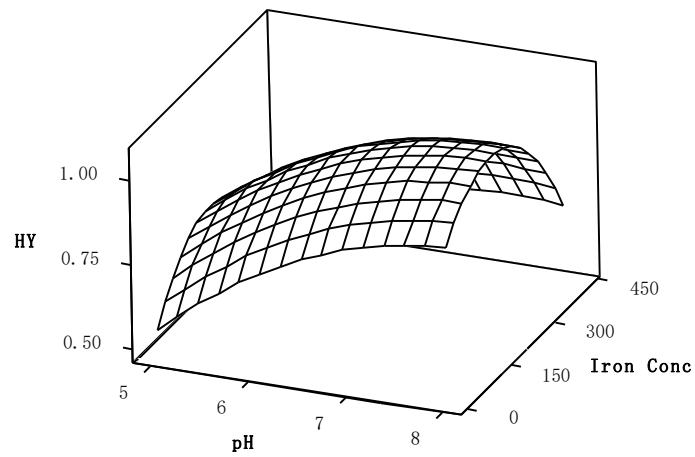
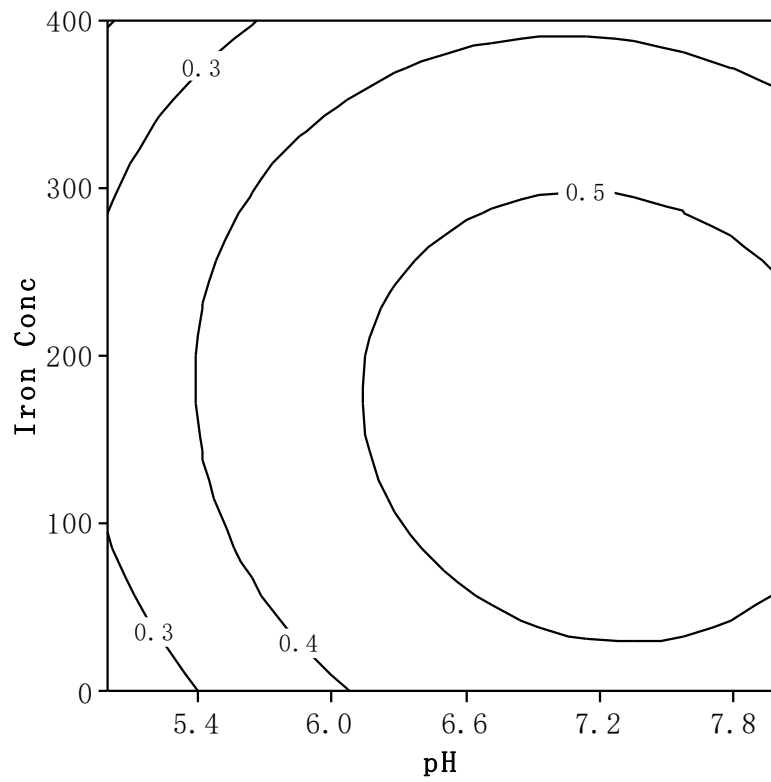


Fig 4-16 Response surface plot and contour plot showing the effect of the iron concentration and initial pH on hydrogen yield.



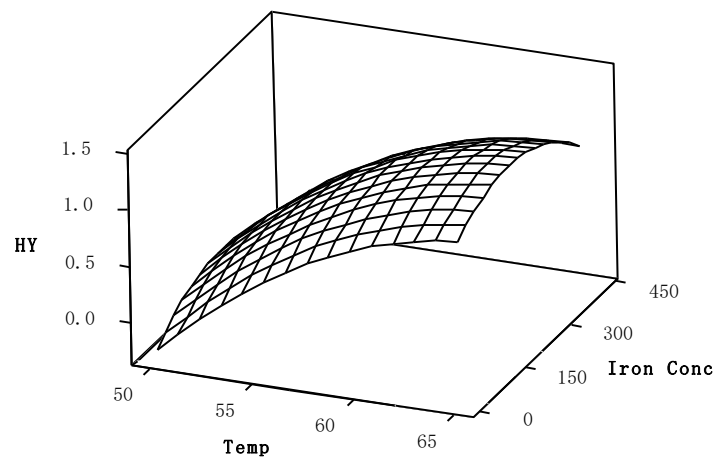
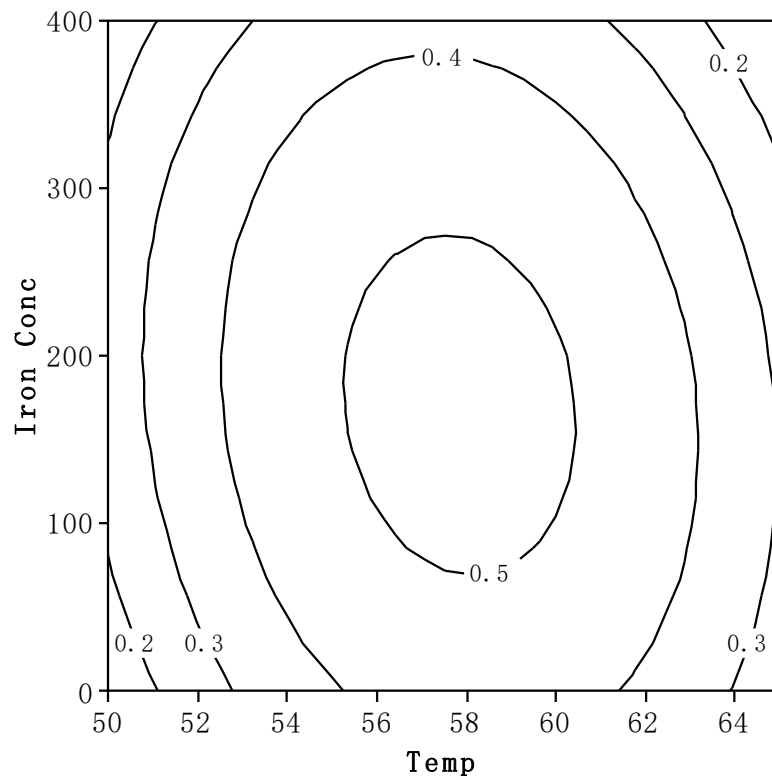


Fig 4-17 Response surface plot and contour plot showing the effect of the iron concentration and temperature on hydrogen yield.

#### 4.6.4 反應最佳化驗證

根據統計顯示，在基質 20 g/L、培養溫度 58°C、pH 7.2 及亞鐵離子濃度 160 mg/L 之條件下培養可以獲得最佳化之產氫量之結果，本實驗將以統計出之數據進行驗證實驗，以證實 MINITAB 反應曲面統計出之最佳化反應條件是否可得最佳之產氫量。實驗結果如圖 Fig 4-18 顯示，細胞的生長在 12 小時候開始進入對數生長期，直到 48 小時候累積的細胞乾重 266 mg/L，接著隨著培養時間細胞數量開始下降，比生長速率為 0.04 hr<sup>-1</sup>。pH 隨著細胞的生長、代謝產物的產生逐漸下降，在培養最終時到達了 pH 6。液相代謝產物主要為乙酸的累積，在培養結束後累積至 22478 mg/L、丁酸的累積為 2463 mg/L 以及少量的丙酸 116 mg/L，在整個產氫發酵過程之中代謝路徑主要是以乙酸發酵為主。在氣相產物的累積部分，最高累積產氫量為 439 mL/L，氫氣的濃度含量最高為 19.54%。在纖維素的降解部分，培養到 72 小時候基質可以降解 39.64% 之固體基質；氫氣的產量為 1.15 mmol H<sub>2</sub>/ g COD，產氫速率 14.96 mL/L · hr (Table 4-10)。

Table 4-11 整理出本實驗最佳化之結果與其它使用固體廢棄物基質發酵產氫之結果。與上述文獻相比，本文研究所使用的茶葉基質與其餘固體基質所得之最佳產氫量介於 Lin 等人使用基質 Molasses 以及 Lee 等人使用 Kitchen waste 中間。

Table 4-10 Hydrogen fermentation from hot pretreated waste tea leaves under optimal condition (58°C, pH 7.2, Fe<sup>2+</sup> 160 mg/L)

Parameters	Values
Specific growth rate (hr <sup>-1</sup> )	0.04
Substrates degradation percentage (%)	39.64
Hydrogen yield ( mmol H <sub>2</sub> / g COD )	1.15
H <sub>2</sub> production rate (mL/L · hr)	14.96
H <sub>2</sub> content (%)	19.54

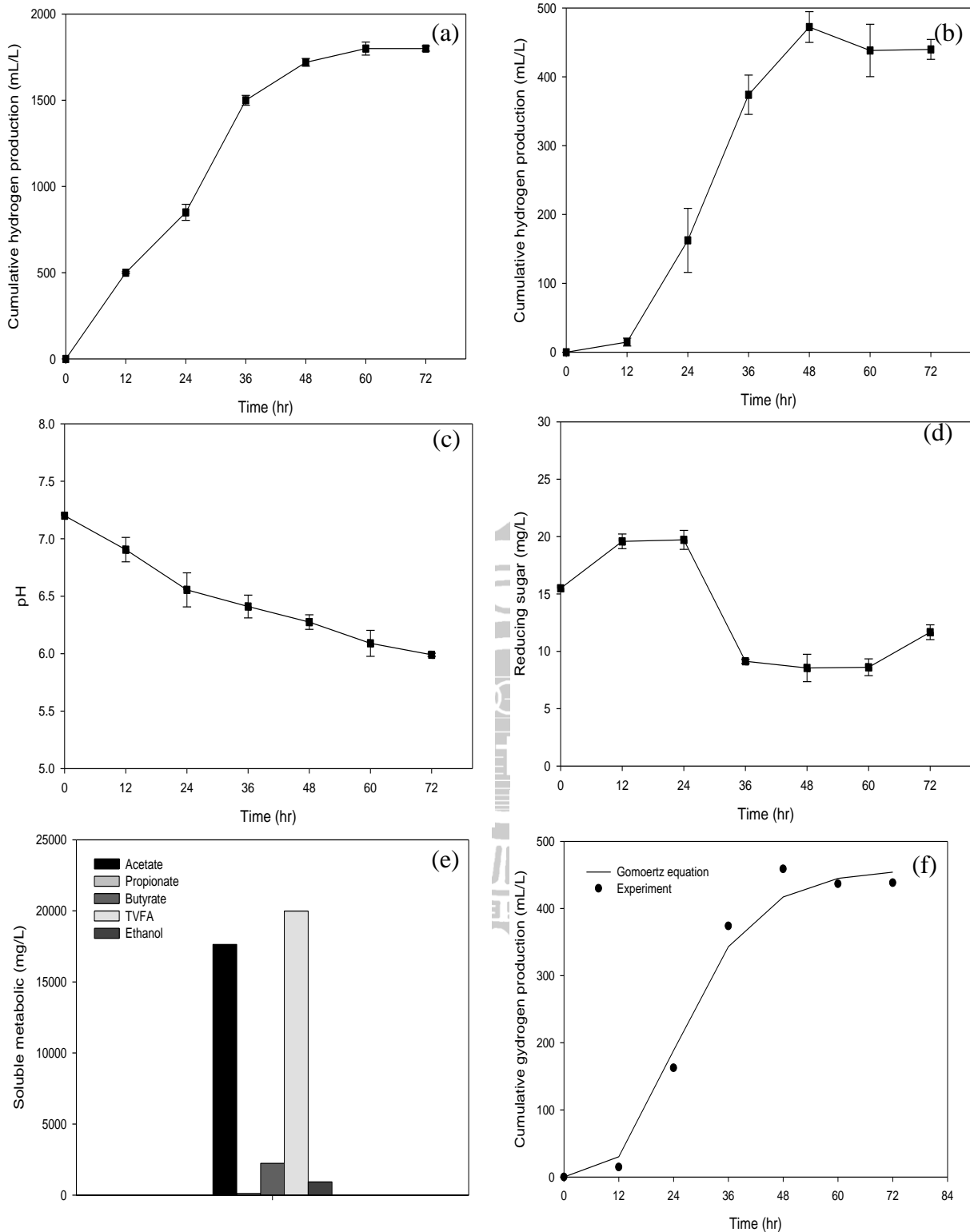


Fig 4-18 Optimal condition on hydrogen production, (a) microbial growth, (b) cumulative hydrogen production, (c) daily pH, (d) reducing sugar, (e) soluble metabolic, (f) gompertz equation. Culture were incubate with pH 7.2, 58°C and iron concentration were 160 mg/L.

Table 4-11 Comparison of hydrogen production yield with other study

Inoculum	Substrate	Yield	Reference
Rumen bacteria	Waste tea	1.15 mmol H <sub>2</sub> / g COD	This study
Cultivate tomato plants soil	Apple processing wastewater	0.1 L H <sub>2</sub> /g COD	Van Ginkel <i>et al.</i> , 2005
Chemical wastewater	Effluent treatment plant	1.25 mmol H <sub>2</sub> /g COD	Venkata Mohan <i>et al.</i> , 2007
Continuously-stirred tank reactor fermentor	Molasses	1 mmol H <sub>2</sub> /g COD	Lin <i>et al.</i> , 2006
Wastewater	Cheese processing wastewater	10 mM/g COD	Yang <i>et al.</i> , 2007
Wastewater	Sucrose and pineapple waste	5.27 mol H <sub>2</sub> /g COD	Wang <i>et al.</i> , 2006
Kitchen waste compost	kitchen waste	0.57 mmol H <sub>2</sub> /g COD	Lee <i>et al.</i> , 2008
Kitchen waste compost	Kitchen waste	1.7 mmol H <sub>2</sub> /g COD	Lee <i>et al.</i> , 2010
Anaerobic sludge	Diary wastewater	0.0317 mmol H <sub>2</sub> /g COD	Mohan <i>et al.</i> , 2008
Waste activated sludge	Food Waste water	4.71 mmol H <sub>2</sub> /g COD	Wu and Lin, 2008
Mix sludge: Sweet potato processing factory, kitchen waste, hydrogen fermentor fed, with starch and peptone, Kitchen waste compost	Starch rich kitchen waste	2.1 mmol H <sub>2</sub> /g COD	Wang <i>et al.</i> , 2010

## 4.7 微生物族群分析

### 4.7.1 變性梯度凝膠電泳族群分析

為了瞭解瘤胃菌群經過抑制後甲烷菌後微生物菌相之變化，使用變性梯度凝膠電泳來觀察每日菌群之變化。實驗使用在最佳化條件下培養之條件，並觀察沒經過抑制與抑制後的菌液，兩者在培養 6 天之差異。在進行 DGGE 實驗前，先使用針對甲烷菌之引子 coccus1F 與 reverse3 對樣品進行確認是否含有甲烷菌，結果如 Fig 4-19，在 2NEOH 中沒有發現甲烷菌的存在，而未經抑制的菌液裡內含有甲烷菌之 16S 片段。

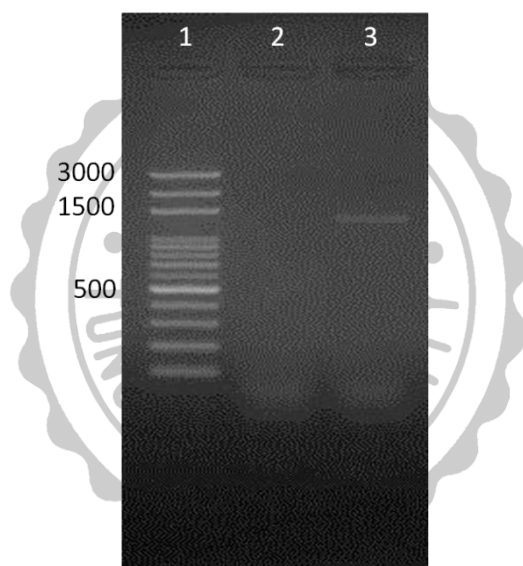


Fig 4-19 Agarose gel electrophoresis analysis of 16S rDNA. Agarose gel concentration 1.5%, Marker 100-3000 bp. Land 1: Marker, Land 2: 2NEOH, Land 3: Rumen.

Fig 4-20 是以變性濃度範圍 35-45%、電壓 200V 泳動時間 7 小時之結果。兩種菌群因為在三年的馴養之下菌相已經非常單純，但從膠圖中明顯可看出經過抑制與沒抑制的瘤胃菌兩種不同之菌相。在兩個樣品中選出共 8 個較明顯之亮帶進行切膠純化，並且將回收之樣品送定序鑑定微生物序列。送驗結果顯示，在 8 組樣品中僅有編號 3 之樣品是純菌，其餘樣品都

含有兩條以上不同序列。從送驗結果判定，某些微生物因基因序列差異不大，在膠圖上因位置太相近肉眼難以分辨誤判為單一亮帶。為了將菌株分離出來，後續實驗將以基因客隆的方式繼續進行。

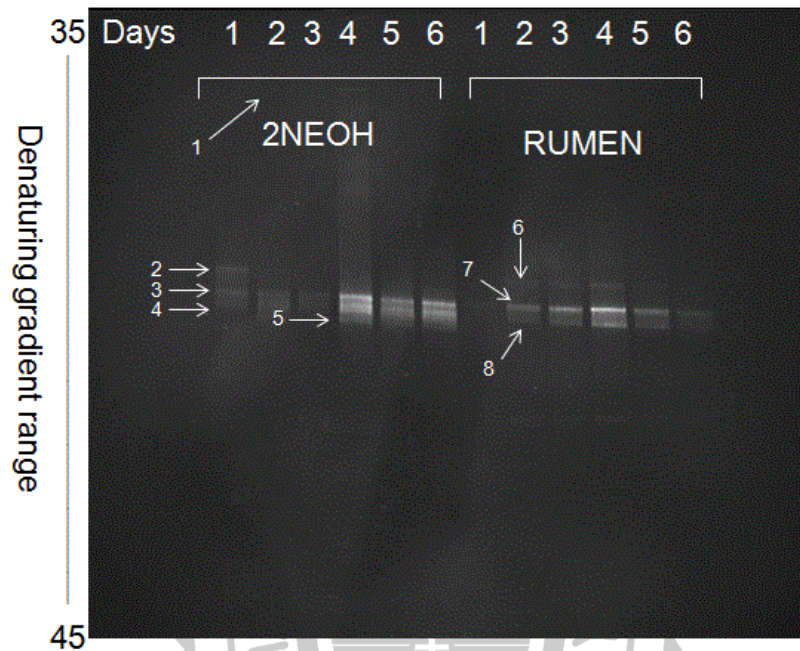


Fig 4-20 Microbial community structure analyses from inhibition and no inhibition at 6 day culture. Denaturing gradient range from 35 to 45%.

#### 4.7.2 微生物菌相親緣分析

將從 DGGE 膠片中切下回溶 DNA 的樣品進行克隆，每組樣品中各挑出 5 株白色菌落並將樣品交送至明欣生物科技公司進行序列鑑定，將定序結果以軟體 MEGA 6 整理過後與基因資料庫比對的結果繪製成親緣樹圖 Fig4-21 及 Fig 4-22。經抑制後的菌液 (2NEOH) 樣本編號為 1 至 5，無經過抑制的菌液 (Rumen) 樣本為 6 至 8。根據 NCBI 上基因資料庫比對的結果，經 2NEOH 抑制後主要由 7 株不同屬之微生物組成，*Thermoanaerobacterium sp.*、*Ralstonia sp.*、*Sediminibacterium sp.*、*Ruminiclostridium sp.*、*Thermohydrogenium sp.* 以及 *Bacteroidetes sp.*。RUMEN 則由 5 株不同屬之為生物組成，分別為 *Thermoanaerobacterium*、*Clostridium sp.*、*Ralstonia sp.*、*Pelomonas sp.* 及 *Bacillus sp.*。

*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* 為一株嗜熱厭氧產氫菌，是屬於為厚壁菌門、能產芽孢之格蘭氏陽性菌，能夠轉換葡萄糖及木糖來產生氫氣；*Thermoanaerobacterium xylanolyticum* 為嗜熱厭氧、能降解木聚糖之微生物，所產生的副產物包括了氫氣、乙酸及乙醇等，此菌株在瘤胃或是一些嗜熱環境如溫泉等都有被發現其存在；*Ruminiclostridium thermocellum* 為一株嗜熱厭氧纖維素水解菌，將纖維素水解後轉換成各類有機酸，由於 *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* 及 *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* 都無法直接水解纖維素，所以 *Ruminiclostridium thermocellum* 是該菌群中扮演著水解纖維素的重要角色；*Ralstonia pickettii* 為一株格蘭氏陰性菌，生長在自然環境如土壤、河流或是潮濕環境中的微生物。此菌為一株病原菌，人類若感染會引起呼吸道方面的疾病，而在瘤胃中也可被發現其存在 (廖等, 2012)，因該菌常存在於受汙染的水源中，可能是牛隻在攝食時藉由口腔感染進入胃裡；*Thermohydrogenium kirishiense* 為一株厭氧嗜熱之非芽孢產氫微生物，它可

以將葡萄糖醱酵後轉換成氫氣及二氧化碳 (Zacharova *et al.*, 1993)，此株菌株的存在驗證了使用化學抑制劑的方式抑制甲烷菌能夠保留住不產芽孢之產氫菌。

Fig 4-22 為沒經過抑制之樣品序列分析結果，在此菌群中同樣的也出現了 *Thermoanaerobacterium sp.* 及 *Ralstonia sp.*。*Bacillus sp.* 是好氧或兼氧之革蘭氏陽性產孢菌，由於該屬菌之產芽孢特性，常經由熱處理的方式篩選出，以用於產氫醱酵的研究上；*Clostridium sp.* 為厭氧產孢革蘭氏陽性菌，同樣的此菌株也常藉由熱處理的方式將其塞選而出來應用在產氫醱酵上；*Pelomonas aquatica* 為一株革蘭氏陰性、非芽孢的桿菌，此菌是經由水體環境之中被分離而出 (Gomila *et al.*, 2007)，不具有纖維素水解之特性，在此瘤胃菌群中被發現可能是因為牛隻在飲水時攝入，因而進入瘤胃中。

在先前批次實驗中，氣相產物分析之中均有檢測到甲烷的存在，但在序列分析結果中卻沒有發現甲烷菌，這可能是由於在進行基因克隆的實驗時DNA序列是隨機嵌入載體中，在選植菌落時無法辨別載入之基因序列。



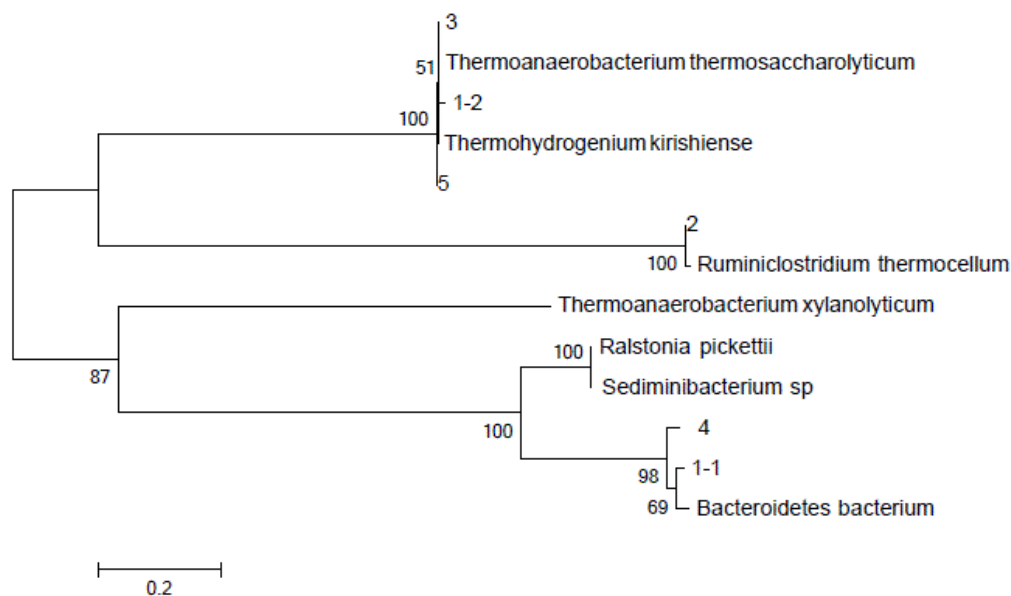


Fig 4-21 Phylogenetic analysis of DGGE fragments from micro flora after 2NEOH inhibition. The dendrogram of the interrelationship was constructed by using maximum likelihood method. Bootstrap replication values calculated from 500 times.

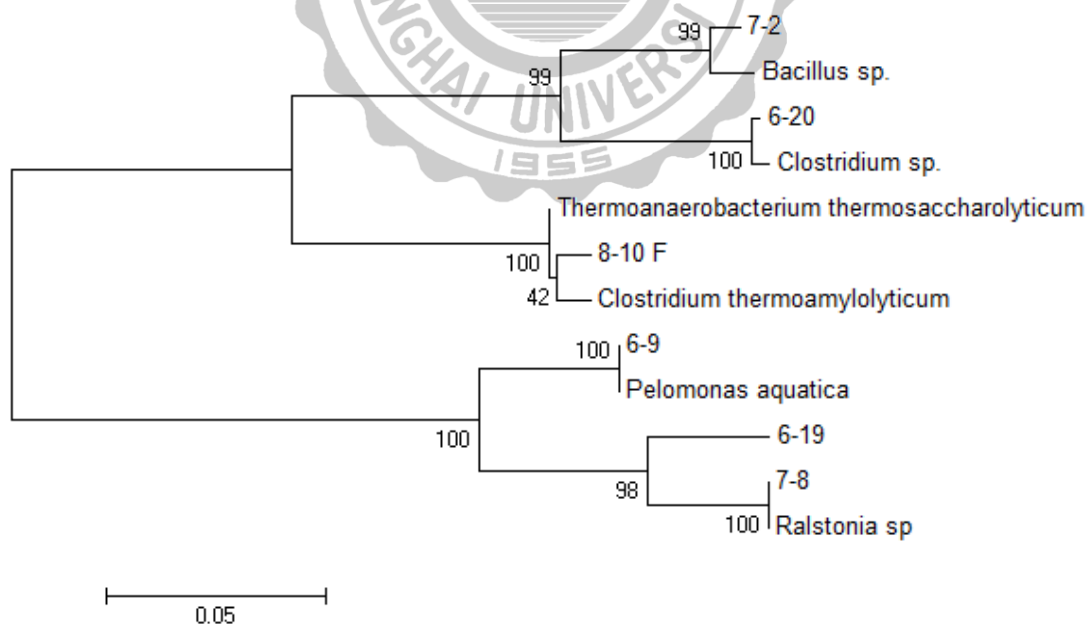


Fig 4-22 Phylogenetic analysis of no DGGE fragments from micro flora without 2NEOH inhibition. The dendrogram of the interrelationship was constructed by using maximum likelihood method. Bootstrap replication values calculated from 500 times.

## 第五章 結論與建議

### 5.1 結論

本研究將瘤胃液微生物菌群以廢紙馴養，在培養六天內可將 5 g/L 廢紙水解完全，同時氣相產物中伴隨著甲烷、二氧化碳以及少量的氫氣。為了保留其水解產氫能力，對瘤胃菌液以 2NEOH 進行抑制，經過抑制後的菌液在生長代謝過程中完全沒有監測到甲烷，並且最高累積氫氣量提升至 291 ml/L。

以熱水將茶葉渣煮沸 30 分鐘可以些微的破壞茶葉表面結構，但破壞的程度不足以釋放出茶多酚，降低茶多酚對微生物生長的干擾，並提升在產氫發酵上的結果。

反應曲面實驗設計上將溫度範圍設定在 50 ~ 65°C、pH 5~8 以及亞鐵離子濃度 0 ~ 400 mg/L，將三個不同因子以中心混成進行共 19 組的實驗，並根據統計分析後繪製出之曲面圖以及等高線圖。得到之最佳產氫量的條件為 58°C、pH 7.2 及亞鐵離子濃度 160 mg/L。在驗證反應曲面之結果的實驗中，微生物的比生長速率為 0.04 day<sup>-1</sup>；纖維素在培養 72 小時的降解率為 39.64%；氫氣的含量為 19.54%；氫氣的產量及產氫的速率分別為 1.15 mmol H<sub>2</sub>/ g COD 及 14.96 mL/L · hr。根據代謝產物的分析結果顯示此微生物之產氫代謝路徑是較偏向乙酸的代謝路徑，乙酸累積量為 22478 mg/L。

經由菌相分析結果顯示，使用化學抑制劑的方式可以保留非芽孢之產氫菌 *Thermohydrogenium kirishiense*，提升產氫之效率。

## 5.2 建議

茶葉因為本身含有的茶多酚會對微生物的生長造成抑制，使得基質在前處理時需避開太過激烈的處理方式，但是這麼一來就無法兼顧減少茶多酚的干擾以及纖維素的破壞，微生物在進行水解的時候較難已將基質完全分解。

本實驗選用之基質屬於較難以利用之特殊基質，但經反應曲面法最佳化後之結果可得氫氣產量  $1.15 \text{ mmol H}_2/\text{g COD}$ ，與其它使用固體基質的研究不相上下，若能克服茶多酚之影響可望能將產氫量提升，因此在未來可以嘗試使用不同之菌株找出能抗茶多酚，同時水解產氫的微生物菌群，並配合培養條件優化提升產氫量。



## 參考文獻

- Abbas, C., Binder, T. P., Beery, K. E. Cecava, M. J., Doane, P. H., Holzgraefe, D. P. and Solheim, L.P. (2009) Process for the production of animal feed and ethanol and novel animal feed. Archer-Daniels-Midland Company
- Anderson, R. C., Krueger N. A., Stanton T. B., Callaway T. R., Edrington T. S., Harvey R. B., Jung Y. S. and Nisbet D. J. (2008) Effects of select nitrocompounds on in vitro ruminal fermentation during conditions of limiting or excess added reductant. *Bioresource Technology*, 99:8655-8661
- Anderson, R. C., Rasmussen, M. A., Jensen, N. S. and Allison, M. J. (2000) Denitrobacterium detoxificans gen. nov., sp. nov., a ruminal bacterium that respire on nitrocompounds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50:633-638.
- Azwar, M. Y., Hussain, M. A and Abdul-Wahab, A. K. (2014) Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31:158-173
- Bhutto, A. W., Bazmi, A. A., Kardar, M. N., Yaseen, M., Zahedi, G. and Karim, S. (2011) Development in hydrogen production through Microbial Processes ; Pakistan's Prospective. *International Journal of Chemical and Environmental Engineering*, 3:189-205
- Blackwood, A. C., Neish, A. C., and Ledingham, G. A. (1956) Dissimilation of glucose at controlled pH values by pigmented and non-pigmented strains of Escherichia coli, *Journal of Bacteriology*. 72:497-499
- Box, G. E. O. and Behnen, 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
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of micro quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 98:289-297
- BP (2014) BP Statistical Review of World Energy. British Petroleum, London, England.
- Cai, J., Wu, Q., Wang, G. and Deng, C. (2013) Fermentative hydrogen production by a new mesophilic bacterium *Clostridium* sp. 6A-5 isolated from the sludge of a sugar mill. *Renewable Energy*, 59:202-209
- Cao, G. L., Ren, N. Q., Zhang, K., Xu, C. J. and Liu, L. H. (2010) Direct conversion of cellulosic substrate to hydrogen production by *Clostridium cellulosi* D3. *Journal of Biotechnology*, 150:563
- Cato, E. P., Holdeman, L. V. and Moore, W. E. E. C. (1982) *Clostridium perenne* and *Clostridium paraperfringens*: Later Subjective Synonyms of *Clostridium barati*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32: 77-81
- Chae, K. J., Choi, M. J., Kim, K. Y., Ajayi, F. F., Chang, I. S and Kim, I. S. (2010) Selective inhibition of methanogens for the improvement of biohydrogen production in microbial electrolysis cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35:3379-3386
- Chen, S. D., Sheu, D. S., Chen, W. M., Lo, Y. C., Huang, T. I., Lin, C. Y., Chang, J. S. (2007) Dark hydrogen fermentation from hydrolyzed starch treated with recombinant amylase originating from *Caldimonas taiwanensis* On1. *Biotechnology Progress*, 23:1312-1320

- Chen, W. J., Tu, Y. J. and Sheen, H. K. (2011) Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. *Applied Energy*, 88: 2726-2734
- Chin, H. L., Chen, Z. S., Chou, C. P. (2003) Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production. *Biotechnology progress*, 19:383-388.
- Collet, C., Adler, N., Schwitzguébel, J. P. and Péringer, P. (2004) Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29:1479-1485
- Collet, C., Gaudard O., Péringer P. and Schwitzguébel JP. (2005) Acetate production from lactose by *Clostridium thermolacticum* and hydrogen-scavenging microorganisms in continuous culture--effect of hydrogen partial pressure. *Journal of Biotechnology*, 118(3):328-338
- Danko, A. S., Pinheiro, F., Abreu, Â. A. and Madalena Alves, A. (2008) Effect of methanogenic inhibitors, inocula type, and temperature on biohydrogen production from food components. *Environmental Engineering and Management Journal*, 7:531-536
- Ding, J., Ren, N. Q., Liu, M. and Ding, L. (2004) Effect of Fe and Fe<sup>2+</sup> on hydrogen production capacity with mixed culture. *Environmental science*, 25:48-53
- Ettwig, K. F. (2006) Degradation of 2-bromo-ethane sulfonate (BES) and 2-mercapto-ethane sulfonate (coenzyme M) by anaerobic enrichment culture. Radboud University Nijmegen, The Netherlands
- Fan, Y. T., Xing, Y., Ma, H. C., Pan, C. M., Hou, H.W. (2008) Enhanced

- cellulose-hydrogen production from corn stalk by lesser panda manure. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:6058-6065
- Gilroyed, B. H., LI, C., Hao, X., Chu, A. and McAllister, T. A. (2010)  
Biohydrogen production from specified risk materials co-digested with cattle manure. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35:1099-1105
- Gomila, M., Bowien, B., Falsen, E., Moore, E. R. B. and Lalucat, J. (2007)  
Description of *Pelomonas aquatica* sp. nov. and *Pelomonas puraquae* sp. nov., isolated from industrial and haemodialysis water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2629-2635
- Gonçalves, M. R., Costa, J. C., Pereira, M. A., Abreu A. A., Alves M. M. (2014)  
On the independence of hydrogen production from methanogenic suppressor in olive mill wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39:6402-6406
- Hall, J. B. and Silver, S. (2009). Nutrition and feeding of the cow-calf herd: digestive system of the cow. Virginia Cooperative Extension, 400-010
- Hara-Kudo, Y., Yamasaki, A., Sasaki, M., Okubo, T., and Minai, Y. (2005)  
Antibacterial action on pathogenic bacterial spore by green tea catechins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85:2354-2361
- Hungate, R. E. (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *In Methods in Microbiology*, 3:117
- IPPC. (2007) Reference document on best available techniques for the manufacture of large volume inorganic chemicals - ammonia, acids and fertilisers. Integrated Pollution Prevention and Control , Rome, Italy.
- Jaworska, M. and Vogt, O. (2013) Sorbitol and cellulose derivatives as gelling agents. *Chemik*, 67:242-249

- Kawagoshi, Y., Hinob, N., Fujimotoa, A., Nakaob, M., Fujitac, Y., Sugimurac, S., Furukawaa, K. (2005) Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100: 524-530
- Kawamura, S. O'., Neil, J. G. and Wilkison, J. F. (1983) Hydrogen production by methylotrophs under anaerobic conditions. *Journal of fermentation technology*, 61:151-156
- Kim, B. H. and Zeikus, J. G. (1985) Importance of hydrogen metabolism in regulation of solventogenesis by *Clostridium acetobutylicum*. *Developments in industrial microbiology*, 26:1-14
- Krupp, M. and Widmann, R. (2009) Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34:4509-4516
- Kumar, A., Jain, S. R., Sharma, C. B., Joshi, A. P. and Kalia V. C. (1995) Increased H<sub>2</sub> production by immobilized microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11:156-159
- Laanbroek, H. J., Smit, A. J., Klein Nulend. G. and Veldkamp, H. (1979) Competition for L -glutamate between specialised and versatile *Clostridium* species. *Archives of Microbiology*, 120:61-66
- Lateef, S. A., Beneragama, N., Yamashiro, T. Iwasaki, M., Ying, C. and Umetsu, K. (2012) Biohydrogen production from co-digestion of cow manure and waste milk under thermophilic temperature. *Bioresource Technology*, 110:251-257
- Lay, C. H., Sen, B., Chen, C. C., Wu, J. H., Lee, S. C and Lin, C. Y. (2013) Co-fermentation of water hyacinth and beverage wastewater in powder



- and pellet from for hydrogen production. *Bioresource Technology*, 135:610-615
- Lee, Y. J., Miyaharab, T. and Noikec, T. (2001) Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, 80:227-231
- Lee, Z. K., Li, S. L., Kuo, P. C., Chen, I. C., Tien, Y. M., Huang, Y. J., Chuang, C. P., Wong, S. C. and Cheng, S. S. (2010). Thermophilic bio-energy process study on hydrogen fermentation with vegetable kitchen waste, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35:13458-13466
- Lee, Z. K., Li, S. L., Lin, J. S., Wang, Y. H., Kuo, P. C., Cheng, S. S. (2008) Effect of pH in fermentation of vegetable kitchen wastes on hydrogen production under at hermophilic condition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:5234-5241
- Li, C., Yang, Z., He Can Zhang, R., Zhang, D., Zhen, S. and Ma, L. (2013) Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. *Journal of Biotechnology*, 168:470-477
- Liang, J., Li, F., Fang, Y., Yang, W., An, X., Zhao, L., Xin, Z., Cao, L. and Hu, Q. (2014) Cytotoxicity and apoptotic effects of tea polyphenol-loaded chitosan nanoparticles on human hepatoma HepG2 cells. *Materials Science and Engineering*: 36:7-13
- Liang, Y., Lu, J., Zhang, L., Wu, S., Wu, Y. (2003) Estimation of black tea quality by analysis of chemical composition and colour difference of tea infusions. *Food Chemistry*, 80:283-290
- Lin, C. Y., Lin, C. Y., Wu, J. H. and Chen, C. C. (2006) A strategy for enhancing fermentative hydrogen production from molasses. *World*

Hydrogen Energy Conference, Lyon, France, Jun. 13-16

- Lin, M., Ren, N., Wang, A. J., Zhang, Y., Wang, X. J. and Ma, F. (2002) Promotion of hydrogen producing ability of hydrogen production bacteria by severalkinds of metal ions. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 35:20-24
- Lin, P. Y., Whang, L M., Wu, Y. R., Ren, W. J., Hsiao, C. J., Li, S. L. and Chang, J. S. (2007) Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32:1728-1735
- Liu, C. Z. and Cheng, X. Y. (2010) Improved hydrogen production via thermophilic fermentation of corn stover by microwave-assisted acid pretreatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35:8945-8952
- Liu, H., Wang, J., Wang, A. and Chen, J. (2011) Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89:1333-1340
- Lo, Y. C., Chen, W. M., Hung, C. H., Chen, S. D. and Chang, J. S. (2008) Dark H<sub>2</sub> fermentation from sucrose and xylose using H<sub>2</sub>-producing indigenous bacteria: Feasibility and kinetic studies. *Water Research*, 42:827-842
- Lope, T., Phani, A. and Mahdi, M. (2011) Biomass feedstock pre-processing– Part 1: Pre-Treatment. *Biofuel's Engineering Process Technology*, Chapter 18
- Masset, J., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Beckers, K., Franck, F. and Thonart P. (2010) Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of

- hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009. *Hydrogen Energ*,35:3371-3378
- Mazzoli, R. (2012) Development of microorganisms for cellulose-biofuel consolidated bioprocessings: metabolic engineers' tricks. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3,e101210007
- Miller, G.L (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-428
- Mohan, S. V and Sama, P.N. (2008) Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource Technology*, 99:59-67
- Montoro, S. R., Medeiros, S. F., Santos, A. M., Silva, M. B. and Tebaldi, M. L. (2013) Application of 2K experimental design and response surface methodology in the optimization of the molar mass reduction of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) (PHBHV). Design of Experiments – Applications, Chapter 6
- Nadi, R. and Sengupta. S. (1998). Microbial production of hydrogen: an overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 24:61-84
- Nagamany Nirmalakhandan, K. R. J. P. (2011) Evaluation of dairy cattle manure as a supplement to improve net energy gain in fermentative hydrogen production from sucrose. *Bioresource Technology*, 102:8688-8695
- Nishida, T., Eruden, B., Hosoda, K., Matsuyama, H., Nakagawa, K., Miyazawa, T and Shioya, S. (2006) Effects of green tea (*Camellia sinensis*) waste silage and polyethylene glycol on ruminal fermentation and blood components in cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal*

*Sciences*, 19:1728 -1736

Nissilä, M. E., Tähti, H. P., Rintala, J. A., Puhakka, J. A. (2011) Thermophilic hydrogen production from cellulose with rumen fluid enrichment cultures: Effects of different heat treatments. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36:1482-1490

Osrttem, K. (2002) Greening waste: anaerobic digestion for treating the the organic fraction of municipal solid wastes. Department of Earth Engineering Center, Columbia University, New York, America.

Schoberth, S. and Gottschalk, G. (1969) Considerations on the energy metabolism of *Clostridium kluyveri*. *Archives of Microbiology*, 65:318-328

Shima, S., Pilak, O., Vogt, S., Schick, M., Meyer-Klaucke, W., Warkentin, E., Thauer, R. K. and Ermler, U. (2008) The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site. *Science*, 321:572-575

Simmering, R., Taeas, D., Schwierzyz, A., Gwenaellele, B., Gruhl, B., Lawson, P. A., Colloms, M. D. and Blaut, M. (2002) *Ruminococcus luti* sp. nov., isolated from a human faecal sample. *Systematic and Applied Microbiology*, 25:189-193

Sleat, R., Mah, R. A and Robinson, R. (1984) Isolation and Characterization of an Anaerobic, Cellulolytic Bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. Nov. *Appl Environ Microbiol*, 48:88-93

Song, Z. X., Wang, Z. Y., Wu, L. Y., Fan, Y. T. and Hou, H. W. (2012) Effect of microwave irradiation pretreatment of cow dung compost on bio-hydrogen process from corn stalk by dark fermentation.

- International Journal of Hydrogen Energy*, 37: 6554-6561
- Tanisho, S., Wakao, N., and Kosako, Y. (1983) Biological hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 16:529
- Tao, L. and Lambert, J. D. (2014). Antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols in cancer prevention. Polyphenols in Human Health and Disease, Chapter 89, 1191-1198
- UNEP. (2009) Towards sustainable production and use of resources: Assessing Biofuels. United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya.
- Van Ginkel, S. W., Oh, S. E. and Logan, B. E. (2005) Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30:1535-1542
- Van Soest, P.J., Robertson, B. J. and Lewis, B.A. (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74:3583-3597
- Varel, V. H., Tanner, R. S. and Woese, C. R. (1995) *Clostridium herbivorans* sp. nov., a cellulolytic anaerobe from the pig intestine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45:490-494
- Venkata Mohan, S., Vijaya Bhaskar, Y., Murali Krishna, P., Chandrasekhara Rao, N., Lalit Babu, V. and Sarma, P. N. (2007) Biohydrogen production from chemical wastewater as substrate by selectively enriched anaerobic mixed consortia: Influence of fermentation pH and substrate composition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32:2286-2295
- Verma, S. (2002) Anaerobic digestion of biodegradable organics in municipal

solid wastes. Department of earth & environmental engineering Fu  
Foundation school of engineering & applied science Columbia  
university.

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

41:1353-1358.

Wang, J. and Wan, w. (2008) Influence of Ni<sup>2+</sup> concentration on biohydrogen  
production. *Bioresource Technology*, 99:8864-8868.

Wang, J. and Wan, W. (2009) Factors influencing fermentative hydrogen a  
review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34:799-781

Wang, Y.H., Li, S.L., Chen, I.C., Tseng, I.C., Cheng, S.S. (2010) A study of  
the process control and hydrolytic characteristics in a thermophilic  
hydrogen fermentor fed with starch-rich kitchen waste by using  
molecular-biological methods and amylase assay. *International Journal  
of Hydrogen Energy*, 35:13004-13012.

Warnick, T. A., Methé, B. A. and Leschine, S. B. (2002) *Clostridium  
phytofermentans* sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil.  
*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,  
52:1155-1160

Wu, J. H. and Lin, C. Y. (2008) Biohydrogen production by mesophilic  
fermentation of food waste water. *Bioresour Technol*, 99:59-67

Wu, X., Yang, H. and Guo L. (2010) Effect of operation parameters on  
anaerobic fermentation using cow dung as a source of microorganisms.  
*International Journal of Hydrogen Energy*, 35:46-51

- Yang, P., Zhang, R., McGarvey, J. A. and Benemann, J. R. (2007)  
Biohydrogen production from cheese processing wastewater by  
anaerobic fermentation using mixed microbial communities.  
*International Journal of Hydrogen Energy*, 32:4761-4771
- Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. (1998) H<sub>2</sub>  
production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and  
*Enterobacter aerogenes*. *Biotechnology Letters*, 20:143-147
- Yokoyama, H., Moriya, N., Ohmori, H., Waki M., Ogino, A. and Tanala. Y.  
(2007) Community analysis of hydrogen production extreme  
thermophilic anaerobic microflora enriched from cow manure with five  
substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77:213-222
- Younesi, H., Najafpour, G. and Mohamed A. R. (2005) Ethanol and acetate  
production from synthesis gas via fermentation processes using  
anaerobic bacterium, *Clostridium ljungdahlii*. *Biochemical Engineering  
Journal*, 27:110-119
- Yu, H., Zhu, Z., Hu, W. and Zhang, H. (2002) Hydrogen production from rice  
winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed  
anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27:  
1359-1365
- Yu, J. and Takahashi, P. (2007) Biophotolysis-based hydrogen production by  
cyanobacteria and green microalgae. *Communicating Current Research  
and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 79-89
- Zacharova, E. V., Mitrofanova, T. I., Krasilnikova, E. N. and Kondratieva, E.  
N. (1993) *Thermohydrogenium kirishiense* gen. nov. and sp. nov., a new  
anaerobic thermophilic bacterium. *Archives of Microbiology*

160:492-497

Zhang, T., Liu, H. and Fang, H. H. P. (2003) Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *Journal of Environmental Management*, 69:149-156

Zhou, Z. M., Meng Q. X. and Yu, Z. T. (2011) Effects of Methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulolytic bacteria in in vitro ruminal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 2634-2639

吳玥禎。(2012)。以草食性蜥蜴腸道菌群進行嗜熱暗醱酵纖維素水解產氫之研究，東海大學環境科學與工程學系碩士班論文。

呂錫民。(2009)。氣化技術。科學發展，435，62-66。

李晉嘉。(2003)。以反應曲面法研究生化柴油之最優化酵素合成，大葉大學食品工程學系碩士班論文。

柯水洲，馬晶偉。(2006)。生物製氫研究進展(I)產氫機理與研究動態。化工進展，25(9)，1001-1010。

張均傑。(2005)。燃料電池的原料來源。生物產業機械。

張嘉修，林國興，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。

葉乃菁。(2011)。以草食性蜥蜴腸道菌群進行嗜熱暗醱酵纖維素水解產氫之研究，東海大學環境科學與工程學系碩士班論文。

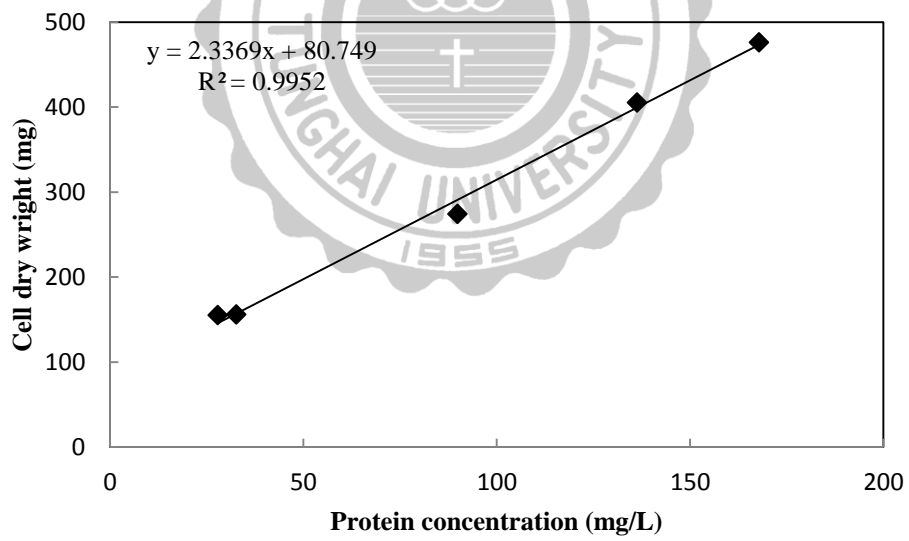
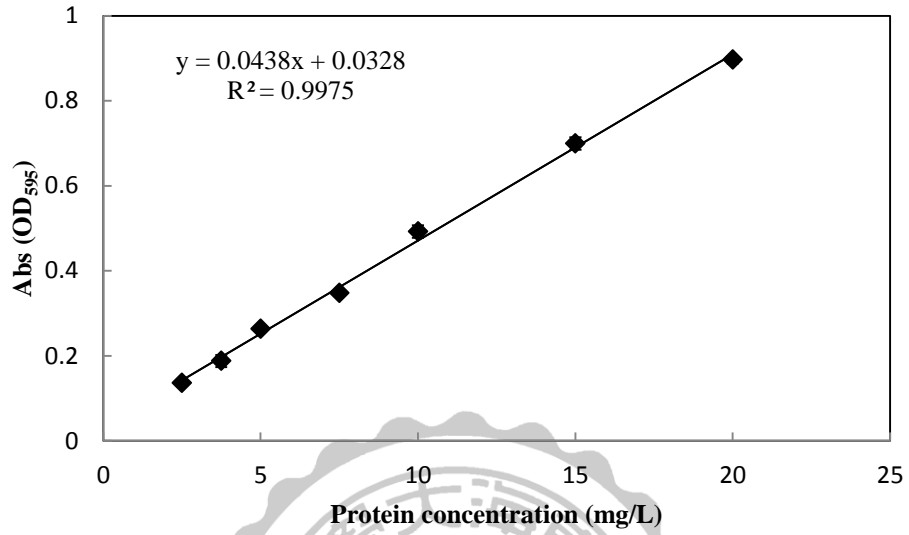
廖仁寶，陳若菁，吳明哲，李佳音，程梅萍。(2012)。從水牛瘤胃微生物多源基因庫篩選新穎脂解酵素基因，畜產研究 45:265-274。

蘇順發。(2013)。儲氫材料。科學發展，483，12-17。

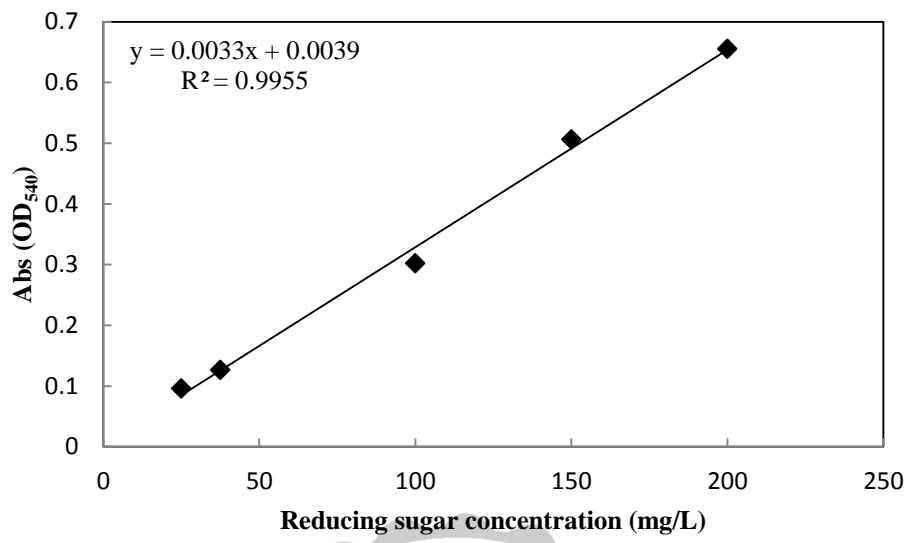


## 附錄

### 附錄一 蛋白質濃度(a)細胞乾重(b)



附錄二 還原糖檢量線



附錄三 氫氣檢量線

